



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS

**HIPERFOSFATEMIA Y
ENVEJECIMIENTO EN SISTEMAS
RENALES Y CARDIOVASCULARES.
PAPEL DE ILK**

TESIS DOCTORAL

NURIA TROYANO SUÁREZ

2013

D. Antonio Jiménez Ruíz, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada *“Hiperfosfatemia y Envejecimiento en los sistemas renales y cardiovasculares: Papel de ILK”*, presentada por **Dña. Nuria Troyano Suárez**, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores D^a María Piedad Ruiz Torres y D^a Gema Olmos Centenero en el Departamento de Biología de Sistemas, y cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública.

Y para que conste y surta todos los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a 23 de mayo de 2012.

D^a M^a Piedad Ruiz Torres, Profesora Titular y **D^a Gema Olmos Centenera**, Profesora Ayudante Doctor, del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: ***“Hiperfosfatemia y Envejecimiento en los sistemas renales y cardiovasculares: Papel de ILK”***, presentada por ***Dña. Nuria Troyano Suárez***, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá, y cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública.

Y para que conste y surta todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Alcalá de Henares, a 23 de mayo de 2012.

A mis padres

*Hay una fuerza motriz más
poderosa que el vapor, la
electricidad y la energía atómica:
la voluntad.*

A. Einstein

AGRADECIMIENTOS

Largo ha sido el camino, pero por fin estoy recorriendo sus últimos pasos. Muchas son las personas que se han cruzado en el, algunas al principio, otras al final y otras han estado a mi lado durante todo su trayecto. Solo puedo mostrar mi gratitud. De todos he aprendido muchas cosas, pero la más importante es a ser tenaz y a luchar por lo que uno quiere.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mi directora, la Dra. María Piedad Ruiz Torres, sin la cual no hubiera podido conseguir esta meta. Gracias por “acogerme”, ser mi guía, por darme todo tu apoyo para que en tan poco tiempo haya salido todo el trabajo hacia delante, por tu esfuerzo, tus buenos consejos y sobre todo por hacerme sentir tan bien trabajando a tu lado. A mi otra directora, la Dra. Gema Olmos Centenero, agradecerle su gran apoyo tanto laboral como moral, siempre optimista. Gracias por ayudarme en esta última etapa tan importante para mí y por saber que siempre se puede contar contigo.

Al Dr. Manuel Rodríguez Puyol, por dejarme un hueco donde realizar mi sueño, por su apoyo, sus consejos y por hacerme recordar que en los cumpleaños también se canta el “amiguito”. Al Dr. Diego Rodríguez Puyol, por guiarnos en nuestro trabajo y compartir sus conocimientos con nosotros. A la Dra. María Luisa Díez, por su apoyo.

A mi primera compi, María, tú me ayudaste a entrar de nuevo en este mundo cuando las cosas se me habían torcido y aparte de apostar por mí, me mostraste tu apoyo y ayuda incondicional. Gracias no sólo por ser mi compañera de laboratorio, sino también de mesa en la facultad, de risas, de lloros y ante todo mi amiga. Aunque ahora estés lejos físicamente siempre estarás cerca. A mi nueva compi Inés, *holaaaa compiiiiii*, gracias por ser mi técnico (no sin mi técnico jajaja), por aguantarme 8 horas durante este último año que muy fácil no ha tenido que ser, por estar siempre que te he necesitado para reír, para cantar (*lloverá lloveré...*) o lo que hiciera falta. Aunque seas la pequeña hay muchas cosas grandes que aprender de ti. Ya sabes... “pero yo te quiero”.

A mi mayor compañera de chorradas, Paloma, que haría sin ti. Gracias por sacarme esa sonrisa que tanto necesita uno siempre, por hacerme reír incluso cuando tenemos los *policeman retarders* al lado, por seguir siendo la misma que hace 13 años, por ser como eres. Siempre me acordare de ti en muchos “sitios”. Mi niña eres increíble y me alegro muchísimo de haberte tenido tan cerca de nuevo. A mi Ali. Si algo tengo que agradecer de pertenecer a este laboratorio es también el haberte conocido. Hemos compartido tantas cosas en tan poco tiempo que es como si te conociera desde hace muchos años. Siempre estas a mi lado de forma incondicional: en *les parres*, en las playas de conil, y para lo que haga falta, pero siempre estás. Vales millones, que nunca se te olvide. Te adoro. Retarders, os quiero.

A Pepelu, gracias por estar siempre tan pendiente de que este bien, por hacerme reír tanto y tantas veces, y por hacerme saber que puedo contar contigo. A Sergio, por ser el pastor descarriado que aparte de ayudarte en el mundo científico se puede tirar horas contigo hablado de música (*tritónnnn X-100*), de política, de cine o de la chorrada más grande que se nos ocurra. A Merce, por estar siempre tan dispuesta a echar esa mano y a enseñar siempre todo lo que sabe de este laboratorio, por las risas y todos los buenos momentos vividos en este tiempo. A mi Lourdes *Zumbera* y a Andrea por todas las risas que nos hemos pasado juntas. A Mali, por su apoyo, que ya viene de lejos, y a Laura, siempre nos quedará París. Al grupo del hospital, por vuestra colaboración, y a Ana, por recordarme lo buenas que están las palmeritas y porque sin ti no tendríamos con que trabajar.

A esas compis pasilleras bioquímicas, con las que siempre echas un buen rato y compartes día a día lo bueno y lo malo de este mundo. A Carol e Irene, por compartir hábitat en los principios y algún que otro cigarrito. A Susana, por su apoyo, te deseo lo mejor con tu tesis. A las unidades de la universidad, por su colaboración.

A todos mis amigos, por apoyarme siempre, no sólo laboral sino personalmente, y tener esa palabra de aliento para animarme a seguir. Mi pequeña Xirrys: desde que te pisé supe que eras grande, aunque te hagas

AGRADECIMIENTOS

llamar *La Bajita*. Señor Chutón, creo que eres la persona que más veces me ha dicho ponte a escribir la tesis en este tiempo, pero porque eres una de las personas que más me ha apoyado en esto y en otras tantas cosas. Carmen, mi bióloga, gracias por estar ahí siempre, para lo bueno y lo malo (*por Málaga*). A ti, por estar siempre ahí de una forma u otra, y animarme siempre a seguir hacia delante creyendo en mí. Os quiero.

A mi familia, por sus ánimos y por estar siempre a mi lado. Monitos y blancanieves, sois lo mejor.

A mis padres, por hacerme ser la persona que soy, por apoyarme hasta el fin, por aguantar mis momentos de frustración, por luchar conmigo para que todo salga hacia delante y por intentar siempre darme todo lo que necesitaba para ser feliz. Soy feliz sólo con teneros a mi lado. Y como no, a mi pequeño kiyo, lo más “salao” de mi casa.

ÍNDICE

ABSTRACT/RESUMEN.....	iii
-----------------------	-----

ABREVIATURAS.....	ix
-------------------	----

INTRODUCCIÓN

1. Senescencia celular	3
1.1 Ciclo celular	4
1.2 Características de la célula senescente	5
1.3 Causas de la senescencia celular	8
1.4 Características de la célula senescente	10
1.1.1 Vía de regulación de p53	11
1.1.2 Vía de regulación de p16 ^{INK4a}	12
2. Senescencia celular y envejecimiento	12
2.1 Vías intracelulares implicadas en el envejecimiento	13
2.1.1 Klotho	13
2.1.2 Estrés oxidativo	15
2.1.3 Factor de transcripción FoxO	19
2.1.4 mTOR (<i>Mammalian target of rapamycin</i>)	20
2.1.5 Factor de crecimiento insulínico (IGF-I)	21
2.1.6 Restricción calórica	21
2.1.7 Proteína Ras	22
3. Hiperfosfatemia como inductora del envejecimiento	24
3.1 Homeostasis del fosfato	25
3.2 Regulación endocrina del fosfato	26
3.2.1 Vitamina D	27
3.2.2 Hormona paratiroidea (PTH)	27
3.2.3 Factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23)	28
3.3 Efecto del fosfato en el funcionamiento celular	31
3.4 Papel del fosfato en el envejecimiento	32
3.4.1 Ratón deficiente en Klotho	32
3.4.2 Ratón deficiente en FGF23	33
3.4.3 Hiperfosfatemia y envejecimiento	33
3.5 Efectos de la hiperfosfatemia sobre el organismo	34
3.5.1 Calcificación vascular	35
3.5.2 Efectos del fosfato sobre la célula de músculo liso vascular	36
3.6 Patologías asociadas a la hiperfosfatemia	38

3.6.1 Enfermedad renal crónica (ERC)	38
3.6.2 Hiperparatiroidismo secundario	40
4. Quinasa ligada a integrinas (ILK)	41
4.1 Estructura e interacciones de ILK	42
4.2 ILK y señalización celular	44
4.3 Papel de ILK en la fisiología y el desarrollo normal de los tejidos	46
4.3.1 Expresión y función de ILK en células de músculo liso vascular	47
4.4 Importancia de ILK en distintos procesos patológicos	48
4.4.1 Papel de ILK en cáncer	48
4.4.2 Papel de ILK en la hipertrofia cardíaca	49
4.4.3 ILK y patología renal	51
4.4.4 ILK y envejecimiento	52
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Diseño experimental	59
1.1 Estudios <i>in vivo</i>	59
1.2 Estudios <i>in vitro</i>	59
2. Estudios <i>in vivo</i>	61
2.1 Animales de experimentación y diseño experimental	61
2.1.1 Recogida de muestras	61
2.2 Técnicas empleadas	61
2.2.1 Medida de los niveles de fosfato en plasma	61
2.2.2 Análisis de la expresión génica. RT-PCR cuantitativa	62
2.2.3 Análisis del contenido proteico en tejido mediante western-blot	63
3. Estudios <i>in vitro</i>	65
3.1 Cultivos celulares	65
3.1.1 Cultivo de células mesangiales humanas	65
3.1.2 Cultivo de células tubulares de ratón	65
3.1.3 Cultivo de células lisas musculares de aorta humanas	65
3.2 Reactivos y condiciones de utilización	66
3.2.1 Estimulantes de la respuesta celular	66
3.2.2 Inhibidores farmacológicos	67
3.3 Técnicas empleadas	67
3.3.1 Análisis del contenido proteico en tejido mediante western-blot	67

3.3.2 Silenciamiento de ILK mediante ARN de interferencia	68
3.3.3 Medida de la actividad β -galactosidasa mediante microscopía confocal	69
3.3.4 Medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno y anión superóxido por microscopía confocal	69
3.3.5 Determinación de los niveles de GSH reducidos	70
4. Análisis estadístico	71
RESULTADOS	69
1. Estudios in vivo de la relación entre la hiperfosfatemia, el proceso de senescencia y los niveles de ILK en el envejecimiento	73
1.1 Los ratones de 15 meses presentan elevados niveles de fosfato sérico disminución de los niveles de la protenina anti-envejecimiento klotho y cambios en los niveles de proteínas implicadas en la regulación del meta del metabolismo Ca-Pi en la corteza renal	75
1.2 Aumento de los niveles de proteínas implicadas en el proceso de senescencia celular en la corteza renal de ratones de 15 meses (p53 y p16 ^{INK4a})	77
1.3 Ratones de 15 meses contienen elevados niveles de ILK en corteza renal. Papel de ILK en el envejecimiento	78
2. Estudios in vitro de los mecanismos implicados en el proceso de senescencia celular. Papel de ILK	80
2.1 Altos niveles de fosfato inducen un aumento en la expresión de ILK y senescencia a nivel vascular	80
2.1.1 El beta-glicerofosfato induce senescencia en células vasculares de músculo liso humanas a través de la vía de p53 y p16 ^{INK4a}	80
2.1.2 La senescencia inducida por el beta-glicerofosfato es dependiente de ILK	83
2.1.3 La senescencia celular inducida por beta-glicerofosfato es dependiente de la vía PI3K-Akt-FoxO	85
2.1.4 El tratamiento con beta-glicerofosfato produce un aumento en el estrés oxidativo celular dependiente de ILK	87
2.1.5 La dieta alta en fosfato induce aumento en los niveles de ILK <i>in vivo</i>	91
2.2 Distintos estímulos senescentes inducen un aumento en la expresión de ILK en células mesangiales humanas y células tubulares de ratón	94
2.2.1 La albumina glicosilada y la glucosa oxidasa inducen senescencia en células mesangiales humanas y células tubulares de ratón.	94

ABSTRACT/RESUMEN

During the aging process, changes lead to a functional impairment of the organs, being the kidney and the vasculature some of the most susceptible. The mechanisms involved in the aging process are under study now at days. The aging process can be accelerated or delay by environmental factors including phosphate. In a population study, the high blood phosphate levels have been inversely correlated with the lifespan from different species. Also hyperphosphatemia is observed in premature aging animal models, such as FGF23 and Klotho knocked out mice.

At the cellular level, the aging process is known as cellular senescence. Cellular senescence is a permanent and irreversible cell growth arrest, which maintains cell viability and metabolic activity. Senescence process can be due to a progressive shortening of telomeres or prematurely induced by various stimuli through cellular pathways p53-p21 and p16^{INK4a}. In vivo studies have shown that aging rat kidneys have elevated levels of p16^{INK4a}, suggesting that senescence can be the onset of aging kidney.

Integrin-linked kinase (ILK) is an intracellular effector between cell and the extracellular matrix that plays a central role in the transduction of many biochemical signals which are initiated by cell-matrix interactions that regulate fundamental processes such as growth, proliferation, survival, differentiation, migration, invasion and angiogenesis. After a previous study where it was found that aging rat kidneys showed high levels of ILK, it raised the possibility that ILK may be carrying out an important role in aging and cell senescence. In cardiomyocyte cultures was observed that overexpression of ILK was correlated with increased expression of p53 and p21.

The present work proposes ILK as a key player in the vascular and renal senescence and aging induced by high phosphate levels.

We show that 15 months old mice, which show signs of aging, got hiperphosphatemia, cellular senescence and high ILK levels in the renal cortex, with a positive correlation between ILK and phosphate levels in plasma. Since

the vascular cells are highly exposed to the blood phosphate levels, we determined if high phosphate levels were inducing cellular senescence in the vascular cells and the implication of ILK.

High phosphate levels induce senescence in human aortic smooth muscle cells via ILK-dependent p53-p21 and p16^{INK4a}. The increase of ILK levels induces oxidative stress through the PI3K-Akt-FoxO axis that finally lead the senescence induction.

We also show that other senescence stimuli such as glycated albumin and glucose oxidase induce cellular senescence in human mesangial cells and mouse tubular cells via p53 pathway ILK dependent manner.

In summary, ILK regulates the cellular senescence induced by different stimuli, supporting the importance of ILK in the renal and vascular aging process.

Los cambios que tienen lugar durante el proceso de envejecimiento conducen a una disminución funcional de los órganos, siendo el riñón y el vaso unos de los más susceptibles. Los mecanismos implicados en el proceso de envejecimiento están siendo objeto de estudio. Se ha visto que éste puede ser acelerado o retardado por factores ambientales entre los que se puede encontrar el fosfato. Elevados niveles de fosfato en sangre han sido correlacionados inversamente con la longevidad de distintas especies en un estudio poblacional. También se ha observado que modelos animales de envejecimiento prematuro, como el ratón knock-out para FGF23 ó el ratón deficiente en Klotho, presentan hiperfosfatemia.

A nivel celular el proceso de envejecimiento se conoce como senescencia celular. La senescencia celular es una parada del crecimiento celular permanente e irreversible, donde la célula mantiene su viabilidad y su actividad metabólica. El proceso de senescencia puede ser debido a un acortamiento progresivo de los telómeros o inducida de forma prematura por diversos estímulos a través de las vías celulares p53-p21 y p16^{INK4a}. En estudios *in vivo* se ha mostrado que riñones de ratas envejecidas presentan elevados niveles de p16^{INK4a}, sugiriendo que la senescencia puede ser el inicio del envejecimiento renal.

La quinasa ligada a integrinas (ILK) es un efector intracelular de las interacciones entre la célula y la matriz extracelular que juega un papel central en la transducción de muchas de las señales bioquímicas que son iniciadas por las interacciones matriz-célula y que regulan procesos fundamentales como son el crecimiento, proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis. Tras un estudio previo donde se observó que riñones de ratas envejecidas presentaban elevados niveles de ILK, se planteó la posibilidad de que ILK pudiera estar llevando a cabo un papel importante en el envejecimiento y la senescencia celular. En cultivos de cardiomiocitos se observó que la sobreexpresión de ILK se correlacionaba con un aumento en la expresión de p53 y p21.

En este trabajo se propone que ILK podría estar desempeñando un papel importante en la senescencia celular y el envejecimiento a nivel renal y vascular inducida por los altos niveles de fosfato.

Mostramos que ratones de 15 meses, que presentan indicios de envejecimiento, muestran hiperfosfatemia, senescencia celular y elevados niveles de ILK a nivel de corteza renal, observándose una correlación positiva entre los niveles de ILK y los niveles de fosfato en plasma. Considerando estos datos, se determinó si los altos niveles de fosfato se encontraban induciendo senescencia a nivel vascular, ya que son las células del vaso las que se encuentran más expuestas a los altos niveles de fosfato en plasma, y se analizaron los mecanismos intracelulares implicados en el proceso, centrándonos en el papel de ILK.

Los resultados obtenidos muestran que las altas concentraciones de fosfato inducen senescencia en células vasculares de músculo liso de aorta humana a través de la vía de p53-p21 y p16^{INK4a}, de forma ILK dependiente. El aumento de ILK conlleva a una situación de estrés oxidativo, por activación de la vía PI3K-Akt-FoxO, que es la causante final de la inducción de las vías de senescencia celular.

En este trabajo se demostrará además, que otros estímulos senescentes, como son la albumina glicosilada y la glucosa oxidada inducen senescencia celular en células mesangiales humanas y células tubulares de ratón a través de la vía de p53 de forma dependiente de ILK.

En resumen, ILK se encuentra regulando el proceso de senescencia celular inducida por distintos estímulos en estirpes celulares renales y vasculares, apoyando la importancia de ILK en el proceso de envejecimiento a nivel renal y vascular.

ABREVIATURAS

ADAM	<i>A disintegrating and metalloproteinases</i>
ADANc	ADN complementario
AG	Albumina G licosilada
AGEs	Productos de glicosilación avanzada
ARF	<i>Alternative reading frame protein</i>
ARNm	ARN mensajero
BGP	Beta-glicerofosfato
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
CAT	C atalasa
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>Cyclin dependent kinase</i>)
CDKi	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
CMH	C élulas m esangiales h umanas
CML	C élulas m usculares l isas v asculares
CTM	Células tubulares de ratón
DCFH- DA	Dihidroclofluoresceína de diacetato
DDR	Daño persistente en el ADN (<i>DNA damage response</i>)
DHE	Dihidroetidio
DNA-	Segmentos de cromatina alterada que refuerzan la senescencia
SCARS	(<i>DNA-Segmentswith chromatin alterations reforcing senescence</i>)
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i>

eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial (<i>endotelial Nitric oxido sintase</i>)
ERC	Enfermedad renal crónica
FA	Adhesión focal (<i>Focal adhesion</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal serum bovine</i>)
FGF23	Factor de crecimiento de fibroblastos 23
FGFR	Receptor FGF23 (<i>FGF 23 receptor</i>)
FoxO	<i>Forkhead box class O</i>
GOx	Glucosa oxidasa
GSH	Glutación
GSK-3 β	Glicogeno sintasa quinasa 3 β (<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>)
HADC	Histona desacetilasa (<i>Histone desacetylase</i>)
HADCi	Inhibición histona desacetilasa (<i>Histone desacetylase inhibitor</i>)
HS	Heparan sulafeto
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I (<i>Insuline-like growth factor I</i>)
ILK	Quinasa ligada a integrina (<i>Integrin-linked kinase</i>)
JNK	<i>Jun-N-terminal kinase</i>
MCLB	Monoclorobimano
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAC	N-acetil-cisteína
NO	Oxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

$O_2^{\cdot -}$	Anión superóxido
$\cdot OH$	Radical hidroxilo
PFA	Acido fosfonofórmico (<i>Phosphonoformic acid</i>)
PH	Plecstrina (<i>Pleckstin homology</i>)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
pRB	Proteína del retinoblastoma
PTH	Hormona paratiroidea
RC	Restricción calórica
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Radicals oxygen species</i>)
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative PCR</i>
SAHF	Regiones citológicamente detectables de heterocromatina asociada a senescencia (<i>Senescence associated heterocromatine foci</i>)
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia (<i>Secretory-associated senescence phenotype</i>)
SA- β -Gal	Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (<i>Senescence associated β-galactosidase activity</i>)
SIRT1	Sirtuina 1
SLC	<i>Solute carrier family</i>
SOD	Superóxido dismutasa (<i>Superoxide dismutase</i>)
TTBS	Tampón-tween tris salino

INTRODUCCIÓN

1. SENESCENCIA CELULAR.

La senescencia celular fue descrita hace más de 40 años como un proceso que limita la proliferación de células normales humanas en cultivo (Hayflick, 1965). La palabra senescencia proviene del latín *senex*, que significa hombre viejo o de avanzada edad.

La senescencia celular se define como un estado de parada de crecimiento permanente e irreversible (Rodier y Campisi, 2011). Las células senescentes mantienen su viabilidad y su actividad metabólica (Kuilman et al., 2010). Con excepción de las células madre embrionarias (Miura et al., 2004), la mayoría de las células competentes en división, incluyendo algunas células tumorales, pueden entrar en senescencia con el estímulo apropiado (Shay y Roninson 2004, Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007).

La senescencia celular debida al progresivo acortamiento telomérico que tiene lugar tras las sucesivas divisiones celulares, como resultado de la pérdida de la actividad de la enzima telomerasa, es lo que se conoce como *senescencia replicativa* (Coppe et al., 2009). Esta erosión de los telómeros genera una señal de respuesta a daño al ADN persistente (DDR; del inglés, *DNA damage response*) que inicia y mantiene la parada del crecimiento senescente (d'Adda di Fagagna et al., 2003).

La senescencia también puede ser inducida por diferentes estímulos sin que exista un acortamiento significativo de los telómeros (Ramirez et al., 2001). Este tipo de senescencia se denomina *senescencia prematura* (Kuilman et al., 2010). Entre los desencadenantes de la senescencia prematura encontramos el daño causado en el ADN por agentes mitogénicos (Bartkova et al., 2006), la activación constitutiva del oncogen Ras, la depleción de nutrientes, la disminución de la proteína supresora de tumores PTEN (Alimonti et al., 2010), las condiciones de estrés oxidativo (Melk, 2003) y la expresión ectópica de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDKis) como p21 y p16^{INK4a} (Rodier et al., 2009).

1.1 CICLO CELULAR.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y su división en dos células hijas. Presenta cuatro fases secuenciales: G_1 -S- G_2 -M. Se podría decir que las fases más importantes son la fase S, donde se produce la replicación del ADN, y la fase M, donde la célula se divide en dos células hijas (Williams y Stoeber 2012). Las fases S y M están separadas por dos espacios de tiempo denominados fase G_1 y fase G_2 . En la fase G_1 existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y ARN. La fase G_2 tiene lugar entre la fase S y la fase M. Durante esta fase la célula se prepara para la entrada en mitosis (Murray, 1993) (Figura 1).

Además de estas cuatro fases del ciclo celular podemos observar una fase de reposo conocida como fase G_0 donde las células se retiran del ciclo celular de forma reversible en respuesta a una alta densidad celular o a la privación de factores de crecimiento (Zetterberg y Larsson 1985). Las células que se encuentran en el ciclo celular se denominan *proliferantes* y las que se encuentran en fase G_0 se llaman células *quiescentes*.

La progresión a través del ciclo celular es dirigida por quinasas dependientes de ciclina (CDK; del inglés, *cyclin dependent kinase*). Estas CDKs se encuentran formando parte de una familia de serina/treonina quinasas que se activan por la unión de su ciclina específica (Malumbres y Barbacid, 2006). Los complejos Ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 y ciclina E-CDK2 conducen a la célula a lo largo de la progresión de la fase G_1 a través de su punto de restricción y comprometen a la célula a finalizar el ciclo (Planas-Silva y Weinberg, 1997). La entrada en la fase S se inicia por el complejo ciclina A-CDK2, mientras que el complejo Ciclina B-CDK1 regula la progresión a través de G_2 y la entrada en mitosis (Figura 1).

La progresión a través de cada una de las fases del ciclo celular y la transición de una fase a la siguiente son controlados por mecanismos sensores denominados puntos de control (checkpoints) (Hartwell y Weinert, 1989). Si un punto de control detecta eventos celulares aberrantes o un ciclo celular incompleto, debido por ejemplo a daños en el ADN, estos checkpoints activan

proteínas efectoras que favorecen la parada del ciclo celular hasta que se resuelva el problema.

Dentro de estas proteínas encontramos los inhibidores de CDK (CKIs), que pueden detener reversiblemente la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, la parada en la fase G_1 puede ser inducida a través de la acción de la familia *INK4* [INK4A(p16), INK4B (p15), INK4C (p18) y INK4D (p19)] que inhibe CDK4 y CDK6, o alternatively, a través de la familia *Cip/Kip* de inhibidores (p21, p27, p57), que suprimen la actividad de CDK2 (Hanahan y Weinberg, 2011) (Figura 1).

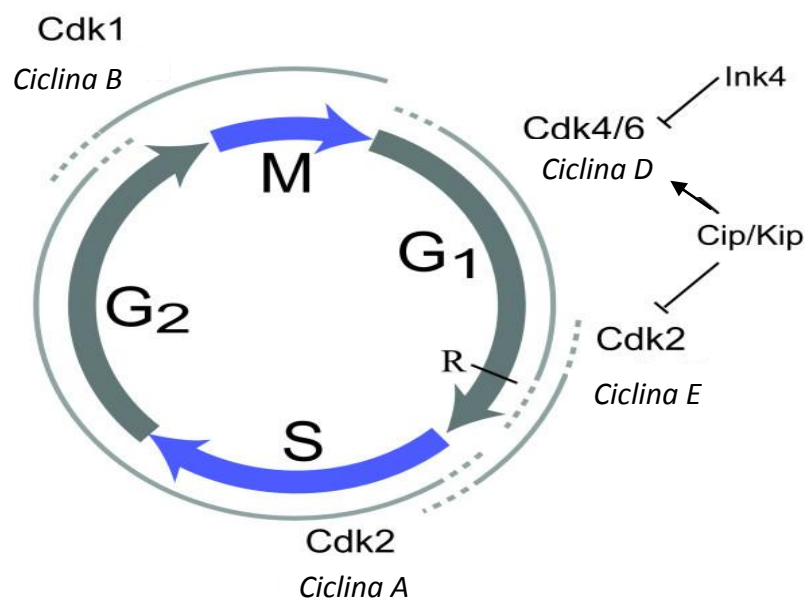


Figura 1. Fases del ciclo celular y puntos de control. Esquema de las distintas fases del ciclo celular, donde se muestran las CDKs correspondientes a la regulación de cada una de las fases del ciclo celular así como sus inhibidores. Fuente: Boxem, 2006.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CELULA SENESCENTE.

Las células senescentes muestran varias características fenotípicas que en conjunto definen el estado senescente (Figura 2). Las principales características de la célula senescente son:

Parada de crecimiento: las células senescentes presentan una parada del crecimiento permanente que no puede ser revertida por estímulos fisiológicos

conocidos. Normalmente esta parada se produce en la fase G₁ del ciclo celular. Sin embargo se ha observado que algunas células senescentes que no expresan el CDKI p16^{INK4a} pueden volver a crecer después de intervenciones genéticas que inactivan el supresor de tumores p53 (Beausejour et al., 2003). Hasta ahora no hay evidencias *in vitro* ni *in vivo* de que la inactivación de p53 se produzca de forma espontánea en células senescentes.

Hipertrofia Celular: las células senescentes presentan un incremento en su tamaño que algunas veces puede llegar al doble de la célula no senescente (Hayflick, 1965).

Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal): Las células senescentes presentan un aumento en la actividad de la enzima β-galactosidasa lisosómica, que es codificada por el gen *GLB*. La enzima β-galactosidasa es una enzima hidrolasa lisosomal cuya función es la de cortar los extremos β-glicosídicos de una variedad de sustratos como gangliósidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Las células no senescentes muestran actividad β-galactosidasa en los lisosomas a un pH 4, mientras que en las células senescentes se muestra una actividad β-galactosidasa a pH 6. Probablemente esta presencia de actividad β-galactosidasa en la célula senescente se deba a una expansión del compartimento lisosomal, aunque hay estudios que indican que algunas células senescentes pueden expresar una forma alternativa de β-galactosidasa que presenta actividad a pH 6, o puede cambiar su localización variando el pH óptimo de actuación (Morreau et al., 1989; Dimri et al., 1995). La SA-β-Gal es comúnmente utilizada como biomarcador de senescencia (Dimri et al., 1995).

Expresión de p16^{INK4a}: la mayoría de las células senescentes expresan el CDKi p16^{INK4a}. En algunas células, a través de la activación de la proteína de retinoblastoma (pRB) por p16^{INK4a}, se genera la formación de regiones citológicamente detectables de heterocromatina asociada a senescencia (SAHF; del inglés, *senescence associated heterochromatine foci*). Esta región silencia genes críticos para la proliferación celular (Narita et al., 2003). Estudios *in vivo*

realizados en humanos y en ratones han mostrado que la expresión de $p16^{INK4a}$ aumenta con la edad (Liu et al., 2009).

Estrés (epi) genético: Debido a la exposición a fuertes señales mitogénicas, como son las producidas por ciertos oncogenes o por la expresión aumentada de genes proliferativos, las células senescentes pueden presentar un daño persistente en el ADN (DDR), dando lugar a una región de daño citológicamente detectable en el núcleo denominada DNA-SCARS (segmentos de cromatina alterada que refuerza la senescencia; del inglés, *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*). DNA-SCARS incluye también telómeros disfuncionales y disrupción de la cromatina. El DDR mantiene la actividad de p53, que a su vez mantiene la parada del ciclo celular (Rodier y Campisi, 2011).

Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP): las células senescentes que presentan un persistente DDR secretan factores de crecimiento, proteasas, citoquinas y otros factores que presentan una importante actividad autocrina y paracrina (Acosta et al., 2008; Coppe et al., 2008).

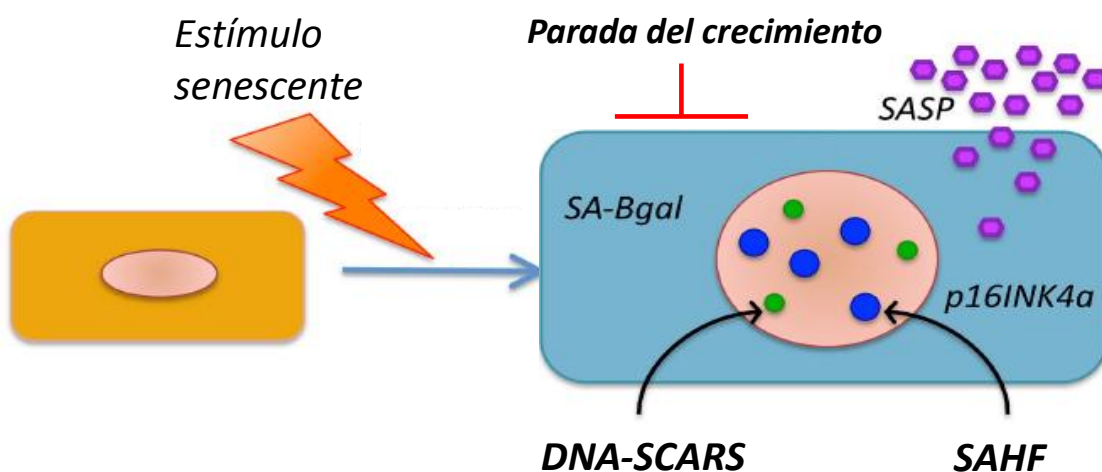


Figura 2. Características de la célula senescente. Las células senescentes muestran parada del crecimiento celular, hipertrofia celular, expresión de $p16^{INK4a}$, secreción de numerosos factores de crecimiento, citoquinas y otros factores (SAPS), actividad β -galactosidasa, segmentos de cromatina alterados que refuerzan la senescencia detectables en núcleo (DNA-SCARS) y formación de regiones detectables citológicamente de heterocromatina asociada a senescencia (SAHF). Fuente: Rodier y Campisi, 2011.

Aunque actualmente no se ha descrito ningún marcador específico del estado senescente; la actividad β -galactosidasa, la expresión de p16^{INK4a}, p53 y p21 se utilizan como marcadores de senescencia.

1.3 CAUSAS DE SENESCENCIA CELULAR.

El proceso de senescencia puede ser inducido por distintos estímulos:

Acortamiento telomérico: los telómeros son secuencias repetidas de ADN que se encuentran asociados a proteínas cubriendo los extremos lineales de los cromosomas protegiéndolos de la degradación o fusión por procesos de reparación de ADN (d'Adda di Fagagna et al., 2004). Debido a que las ADN polimerasas no son capaces de replicar de forma completa la hebra de ADN y a la ausencia en la mayor parte de las células somáticas de la enzima telomerasa (enzima encargada de sintetizar *de novo* la región telomérica), las células pierden durante cada fase S unas 50-200 pares de bases en los telómeros (Harley et al., 1990). Este acortamiento telomérico desestabiliza la estructura del cromosoma y es el responsable de desencadenar el proceso de senescencia (Martens et al., 2000).

Daño en el ADN: daños severos en el ADN, en cualquier región del genoma hacen que muchos tipos celulares entren en senescencia, como por ejemplo los producidos tras la exposición a fármacos quimioterapéuticos. Tanto la senescencia inducida por daño en el ADN como la inducida por el acortamiento telomérico, son dependientes de la vía de regulación de p53 y p21 (Di Leonard et al., 1994). Sin embargo, en muchas células, también se puede inducir la activación de p16^{INK4a}, proporcionando una segunda barrera para evitar el crecimiento de células con ADN gravemente dañado o telómeros disfuncionales (Beausejour et al., 2003).

Perturbación de la cromatina: el estado de la cromatina determina qué genes se encuentran activos (eucromatina) o cuáles silenciados (heterocromatina). Este estado depende principalmente de modificaciones sobre las histonas (acetilación y metilación). Se ha podido observar cómo la

inhibición química de la actividad histona desacetilasa (HADCi; del inglés, *histone deacetylase inhibition*), que promueve la formación de eucromatina, induce senescencia (Ogryzko, Hirai et al. 1996). El mecanismo por el cual tiene lugar el proceso es poco conocido y depende de la especie y del tipo celular. Mientras que en fibroblastos humanos se ha observado que HADCi induce la expresión de p21 y p16^{INK4a}, en fibroblastos de ratón la vía de p53 es la más importante en la senescencia en respuesta a HADCi (Munro et al., 2004).

Oncogenes: los oncogenes son versiones mutantes de genes normales que tienen el potencial de transformar a las células con mutaciones adicionales. Las células normales responden a muchos oncogenes entrando en senescencia (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). Este fenómeno fue observado por primera vez cuando una forma oncogénica del gen Ras, una proteína citoplasmática que transmite señales mitogénicas, se expresó en fibroblastos normales humanos (Serrano et al., 1997).

Estrés oxidativo y otros factores: El potencial replicativo de las células primarias está influenciado por los niveles de oxígeno que hay en cultivo, de hecho se conoce que la disminución de la tensión de oxígeno puede prevenir la senescencia inducida por oncogenes en fibroblastos humanos (Lee et al., 1999). Es conocido, cómo las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la mitocondria, están involucradas en el proceso de senescencia (Lu y Finkel, 2008). Recientes estudios han sugerido que la senescencia inducida por ROS es debida al daño en el ADN y esta mediada por la vía de p21 y p53 (Passos et al., 2010), aunque también p16^{INK4a} puede activarse en respuesta al estrés oxidativo.

Por otro lado la señalización sostenida por ciertas citoquinas anti-proliferativas, como el interferón- β , también inducen senescencia. La estimulación crónica con interferón- β aumenta los niveles de ROS intracelulares y provoca senescencia dependiente de respuesta a daño al ADN y p53 (Moiseeva et al., 2006). Del mismo modo la señalización crónica con el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) induce senescencia a través de la vía de p16^{INK4a} (Vijayachandra et al., 2003).

1.4 VÍAS DE REGULACIÓN DE SENESCENCIA.

El proceso de senescencia puede estar regulado por dos vías independientes que pueden interactuar entre sí y que responden a distintos estímulos: p53 y p16-RB (Figura 3).

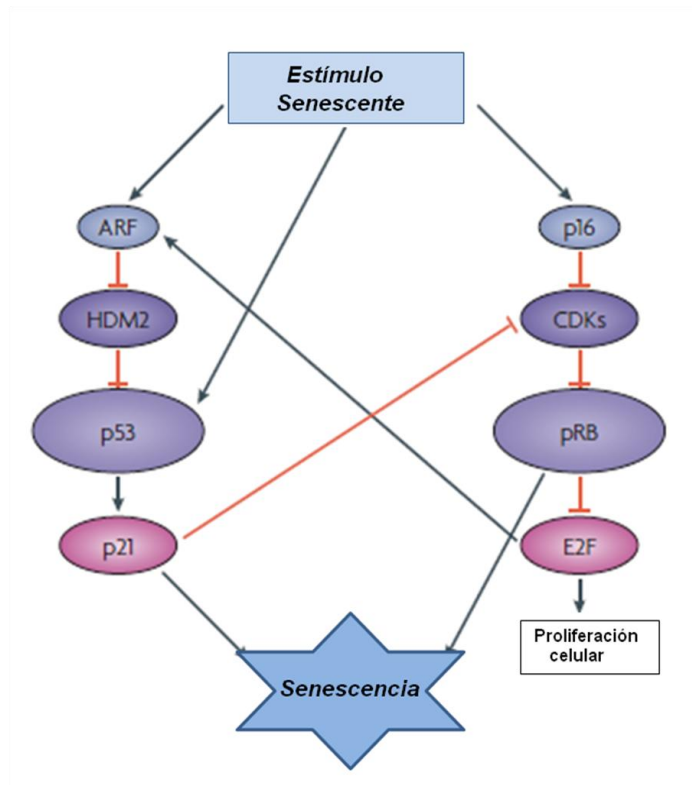


Figura 3. Senescencia controlada por las vías p53 y p16-RB. Esquema de las vías moleculares implicadas en la regulación de la senescencia celular mediada a través de la vía de señalización de p53-p21 y la vía de señalización de p16^{INK4a}-RB. Fuente: Campisi and d'Adda y Fagagna, 2007.

En ambas vías la parada del ciclo celular tiene lugar mediante la regulación de la proteína del retinoblastoma (pRB), proteína supresora de tumores que se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer. Su principal función es la inhibición del ciclo celular entre las fases G₁ y S. Para realizar esta función pRb se une e inhibe factores de transcripción de la familia E2F, que están compuestos de dímeros de una proteína E2F y una proteína DP. Los complejos E2F-DP son capaces de activar la transcripción de una serie de genes que

inducen la entrada de la célula en fase S (de Jager et al., 2005). Cuando pRb se une a E2F, el complejo se inactiva, permaneciendo la célula estancada en la fase G₁ e inhibiendo la proliferación celular (Korenjak y Brehm, 2005) (Figura 4). El complejo pRb-E2F/DP también produce la unión de una histona desacetilasa (HDAC) a la cromatina, lo cual disminuye la unión de factores de transcripción que promueven la entrada en fase S, amplificando así la inhibición de la síntesis de ADN.

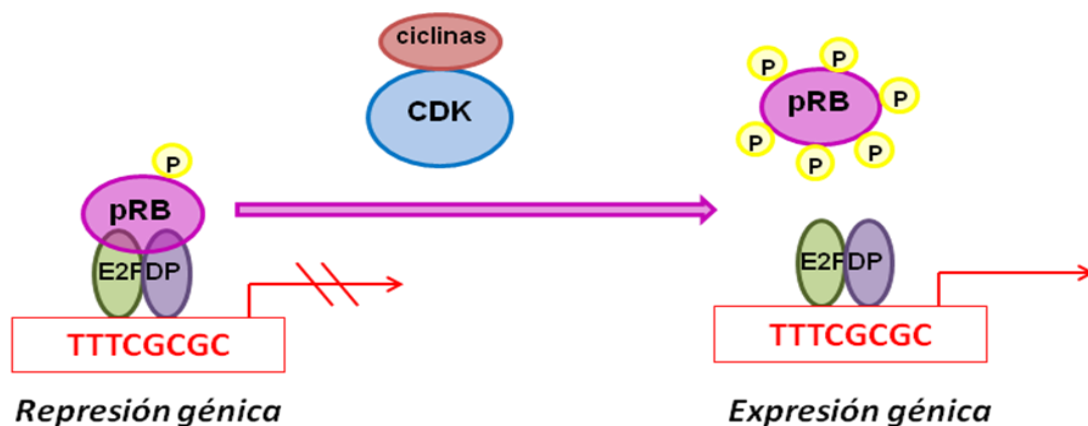


Figura 4. Regulación de pRB. pRB puede encontrarse en dos estados: hipofosforilado e hiperfosforilado. En el estado hipofosforilado pRB es activo. Cuando se precisa que la célula se divida, CDKs y ciclinas fosforilan pRB inhibiendo su actividad. Fuente: Vietri et al., 2006.

1.4.1 VÍA DE REGULACIÓN DE p53:

Estímulos que generan respuesta al daño a ADN, como por ejemplo la radiación ionizante o la disfunción de los telómeros, inducen senescencia principalmente a través de esta vía. Esta vía se encuentra regulada por la proteína E3 ubiquitin ligasa HDM2 (MDM2 en ratones) que une p53 con ubiquitinas para ser degradada vía proteosoma. HDM2 a su vez se encuentra regulada negativamente por la proteína ARF (del inglés, *alternative reading frame protein*) (Sherr y McCormick, 2002). En presencia del estímulo senescente se activa ARF que inhibe a HDM2, inhibiendo así la degradación de p53 por el proteosoma. p53 activo actúa como factor de transcripción de p21, un inhibidor de CDK, que suprime la fosforilación de la pRB, activándola y dando lugar a una parada del ciclo celular.

1.4.2 VÍA DE REGULACIÓN DE p16:

p16^{INK4a} es un inhibidor de CDKs, en concreto de las CDK4 y CDK6, que previene la fosforilación de pRB y por tanto su activación. Esta vía de señalización puede ser inducida tanto por estímulos que producen DDR como por el oncongen Ras o por activación del factor de transcripción ETS (Ohtani et al., 2001). Esta vía es crucial para la generación de SAHFs, silenciando genes necesarios para la proliferación (Narita et al., 2003).

Aunque en la mayoría de los casos el proceso de senescencia es dependiente de la vía de p53 y p16^{INK4a}, también se han observado casos de senescencia que parecen ser independientes de ambas vías de regulación (Olsen et al., 2002).

2. SENESCENCIA CELULAR Y ENVEJECIMIENTO.

La presencia de células que expresan uno o más marcadores de senescencia es relativamente rara en organismos jóvenes. Se ha observado que el número de células senescentes incrementa con la edad en rangos del 1 al 15% dependiendo del estudio, la especie y el tejido (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007).

También se ha observado presencia de células senescentes asociadas al daño por patologías relacionadas con el envejecimiento como osteoartritis, arterioesclerosis y fibrosis tubulointersticial renal (Chang y Harley, 1995).

Existen tres escenarios posibles a través de los cuales las células senescentes pueden conducir al proceso de envejecimiento:

- 1) La senescencia celular puede disminuir la presencia de células progenitoras o células madre en los tejidos. Esta disminución puede comprometer la reparación y regeneración tisular pudiendo, dar lugar a déficits funcionales (Drummond-Barbosa, 2008).
- 2) Los factores que secretan las células senescentes afectan a procesos vitales tales como el crecimiento celular, la migración, la formación de

vasos sanguíneos, la arquitectura de los tejidos y el proceso de diferenciación. Por ejemplo, las metaloproteasas MMP3 secretadas por fibroblastos senescentes inhiben la diferenciación funcional y morfológica de células epiteliales de pulmón (Parrinello et al., 2005).

- 3) El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) incluye potentes citoquinas inflamatorias (Freund et al., 2010). La inflamación de bajo nivel y crónica es una característica del envejecimiento que inicia o promueve la mayoría de las enfermedades relacionadas con la edad (Franceschi et al., 2007).

2.1 VÍAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN EL ENVEJECIMIENTO.

2.1.1 KLOTHO.

El gen Klotho codifica para una proteína transmembrana y se expresa principalmente en el riñón y en el plexo coroideo. El ratón deficiente en Klotho desarrolla un síndrome de envejecimiento precoz (Kuro-o et al., 1997), mientras que el ratón que sobreexpresa Klotho presenta un aumento en su esperanza de vida (Kurosaki et al., 2005). La proteína Klotho está compuesta por un largo dominio extracelular de 130 KDa, un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto de unos 10 aminoácidos. El dominio extracelular presenta homología con la familia 1 de glucosidasas, enzimas capaces de hidrolizar los extremos glicosídicos de glicoproteínas, glicolípidos y azúcares. El dominio extracelular es liberado al espacio extracelular como resultado de la ruptura proteolítica de Klotho por enzimas metaloproteinasas como son ADAM-10 y ADAM-17 (del inglés, *A disintegrin and metalloproteinases*). Este es detectable en sangre, orina y líquido cerebroespinal (Imura et al., 2004, Chen et al., 2007). Por tanto, existen dos isoformas de Klotho: Klotho transmembrana y Klotho soluble (Figura 5).

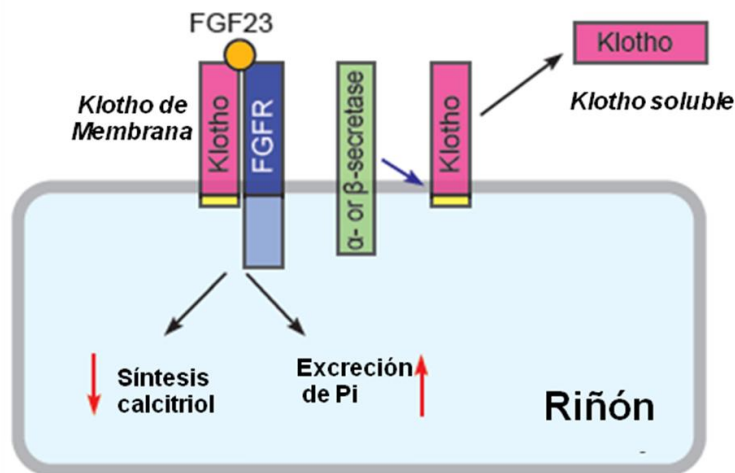


Figura 5. Klotho transmembrana y Klotho soluble. Klotho de membrana forma un complejo con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) creando un sitio de alta afinidad de unión para FGF23. Klotho de membrana se encuentra sujeto por un ectodominio sobre el cual actúan metaloproteinasas para liberar Klotho secretado. Fuente: Kuro-o, 2011.

Klotho transmembrana: La principal función de Klotho es actuar como cofactor del factor de crecimiento de fibroblastos FGF23 (del inglés, *fibroblast growth factor*). FGF23 presenta una baja afinidad por su receptor. Klotho forma un complejo binario con el receptor FGF (FGFR; del inglés, *FGF receptor*) creando un sitio de unión de alta afinidad para FGF23 (Goetz et al., 2007). FGF23 es una hormona sintetizada en el hueso que actúa a nivel renal como hormona fosfatúrica y suprimiendo la síntesis de vitamina D (Quarles, 2008). Klotho-FGF23 se encuentran formando parte de un eje endocrino que comprende el hueso, el riñón y la glándula paratiroidea implicado en la homeostasis del fósforo y el calcio (John et al., 2011).

Klotho soluble: La forma soluble de Klotho presenta funciones pleiotrópicas como un factor humoral independientemente de FGF23.

Se ha observado que la forma soluble de Klotho se encuentra regulando los canales de calcio TPRV5, que se encuentran en la región luminal de los túbulos distales en el riñón implicados en la reabsorción del calcio. El número de canales presentes en la célula está regulado por la velocidad de endocitosis. Klotho suprime la endocitosis de TPRV5 gracias a su actividad sialidasa por la cual elimina los ácidos sialícos del extremo N-glicano de TPRV5 incrementando

el número de canales de calcio en la superficie celular (Chang et al., 2005; Cha et al., 2008). Gracias a esta actividad sialidasa Klotho soluble es capaz de modificar los grupos N-glicanos del cotransportador de fosfato dependiente de sodio tipo II (Npt2a), presente en la membrana en cepillo de células tubulares renales, provocando su inactivación y su degradación proteolítica (Hu et al., 2010). A su vez también suprime cotransportadores de fosfato dependientes de sodio de tipo III (Pit-1 y Pit-2) presentes en células vasculares (Hu et al., 2011).

Klotho soluble regula la actividad de múltiples factores de crecimiento, incluyendo la vía insulina/factor de crecimiento insulínico (IGF-1)(Kurosu et al., 2005), Wnt (Liu et al., 2007) y TGF- β (Doi et al., 2011). Debido a que la adecuada supresión de la vía insulina/IGF-1 ha sido identificada como un mecanismo conservado evolutivamente en el aumento de la esperanza de vida (Kenyon, 2005), se ha propuesto que las propiedades anti-envejecimiento de Klotho podrían ser debidas en parte a su habilidad para suprimir esta vía (Kenyon, 2005, Kurosu et al., 2005).

2.1.2 ESTRÉS OXIDATIVO.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo celular están relacionados con muchos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo envejecimiento, migración, proliferación, senescencia y muerte celular (Birben et al., 2012) (Figura 6).

Los ROS son producidos por los organismos vivos durante el metabolismo celular. A bajas y moderadas concentraciones actúan en procesos fisiológicos, pero a altas concentraciones producen alteraciones de componentes celulares tales como lípidos, proteínas y induciendo daño celular (Wang et al., 1996; Marnett, 1999; Valko et al., 2006).

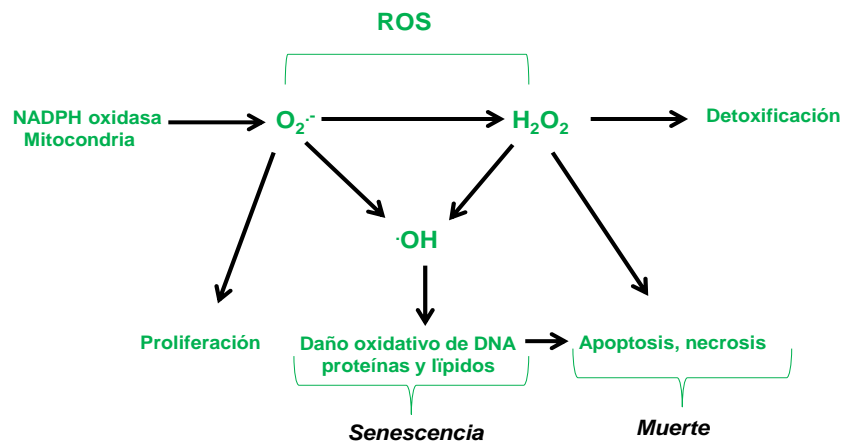


Figura 6. ROS y su papel dentro de la célula. Los principales ROS incluyen superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). $O_2^{\cdot-}$ es principalmente generado por la mitocondria o la enzima NADPH oxidasa e induce proliferación. $O_2^{\cdot-}$ es dismutado dando lugar a H_2O_2 que en concentraciones patológicas puede inducir muerte celular por apoptosis o necrosis. Tanto H_2O_2 como $O_2^{\cdot-}$ pueden formar $\cdot OH$ que es capaz de dañar macromoléculas induciendo senescencia o muerte celular. Fuente: Storz. 2011.

Los ROS con mayor relevancia patológica son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). El anión superóxido se forma por la adición de un electrón a la molécula de oxígeno por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NAD(P)H; del inglés, *nicotine adenine dinucleotide phosphate*), por xantina oxidasa o por la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. (Miller et al., 1990). El lugar de mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ es la mitocondria, normalmente los electrones son transferidos a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial para la reducción de O_2 a H_2O , pero aproximadamente del 1 al 3% de todos los electrones se escapan del sistema y se produce el $O_2^{\cdot-}$ (Figura 7).

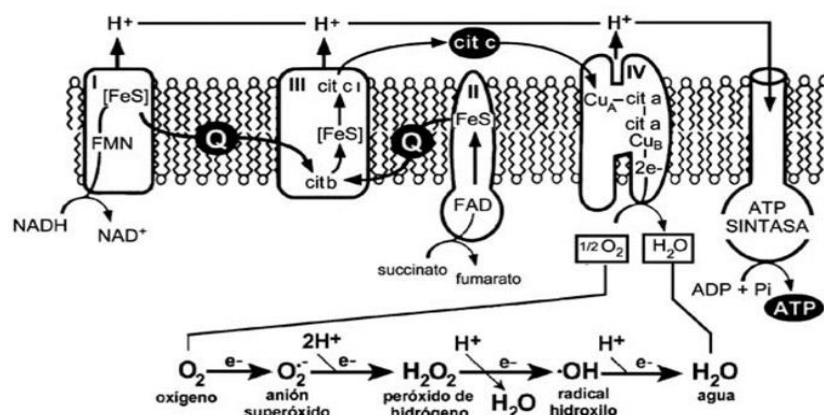
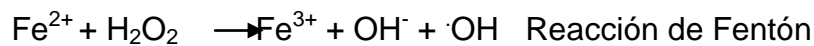
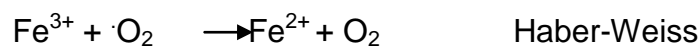


Figura 7. Esquema de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Puntos de producción de $O_2^{\cdot-}$ Fuente: Storz, 2011.

El anión superóxido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno por acción de la superóxido dismutasa (SOD). Este difunde fácilmente a través de la membrana celular. El H_2O_2 puede ser producido también por xantina oxidasa, aminoácido oxidasa, NAD(P)H oxidasa (Dupuy et al., 1991) y en peroxisomas por el consumo de moléculas de oxígeno en reacciones metabólicas.

En una sucesión de reacciones denominadas Haber-Weiss y reacción de Fenton, el H_2O_2 puede dar lugar a $\cdot\text{OH}$ en presencia de metales de transición como Fe^{2+} o Cu^{2+} .



O_2^- puede reaccionar con el H_2O_2 y generar OH^- (Liochev y Fridovich, 2002). El radical hidroxilo es la ROS más reactiva y puede producir daño en proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN.

Regulación del estrés oxidativo:

La homeostasis intracelular de ROS se mantiene de forma constante gracias a la presencia en la célula de sistemas celulares de desintoxicación que evitan el daño celular. Estos sistemas se encuentran constituidos por enzimas antioxidantes que limpian de forma específica distintos tipos de ROS (Storz, 2011) (Figura 8) y moléculas no enzimáticas.

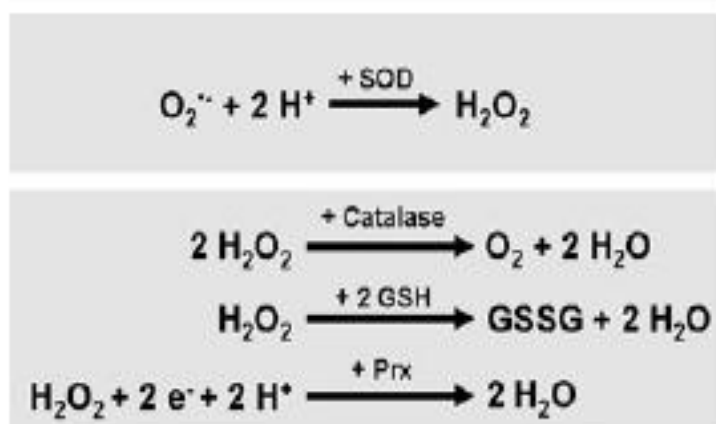


Figura 8. Detoxificación celular de ROS. La detoxificación de las células de ROS se realiza por varias proteínas y enzimas antioxidantes como la SOD, catalasa, glutatión peroxidasa y sistema tioredoxina/peroxirredoxina. Fuente: Storz, 2011.

La dismutación de $O_2^{\cdot -}$ a oxígeno y agua es realizada principalmente por superóxido dismutasas (SODs). SOD tiene varias isoformas que se encuentran en diferentes compartimentos celulares, la MnSOD se encuentra en matriz mitocondrial mientras que la Cu/ZnSOD se encuentra en citosol (Copin et al., 2000).

La descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno es mediada por la catalasa que se encuentra localizada en el citosol (Bendayan y Reddy, 1982; Hashimoto y Hayashi 1990), numerosas peroxirredoxinas (Prxs) localizadas en el peroxisoma, mitocondria y citosol (Hofmann et al., 2002) y glutatión peroxidasa localizadas en el citosol y la mitocondria (Ursini et al., 1995).

Entre las moléculas no enzimáticas que forman parte del sistema de detoxificación de la célula se encuentran la vitamina C, vitamina E, carotenoides y glutatión (GSH) (Birben et al., 2012). El GSH es un tripéptido no proteico que protege a la célula del estrés oxidativo por la reducción de uniones disulfuro de proteínas citoplasmáticas a cisteínas. Durante este proceso el GSH es oxidado a GSH disulfuro. La regeneración del “pool” de GSH es mediado por la acción de la enzima GSH reductasa (Beutler, 1969; Carlberg y Mannervik, 1975).

Cuando el balance oxidación/antioxidación se desequilibra a favor de los oxidantes, se produce lo que se conoce como “estrés oxidativo”, que contribuye en muchos procesos patológicos como cáncer, desórdenes neurológicos, arterioesclerosis, hipertensión, etc...(Toshniwal y Zarling, 1992; Dhalla et al., 2000; Jenner, 2003).

Estrés oxidativo y envejecimiento:

En 1965, Harman, postuló la teoría de los radicales libres como causantes del envejecimiento: la acumulación de daño producido por ROS durante el tiempo puede facilitar el proceso de envejecimiento dentro de las células y sobre todo en los organismos vivos (Harman, 1956). Esta hipótesis fue apoyada por observaciones que muestran que la esperanza de vida de un amplio rango de animales es proporcional a su tasa metabólica y por tanto a la velocidad de los organismos de generar ROS (Storz, 2006). Antioxidantes dietéticos y químicos,

así como la restricción calórica, pueden disminuir la producción de ROS, lo que se traduce en un aumento en la esperanza de vida (Finkel y Holbrook, 2000).

2.1.3 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FOXO.

FoxO (del inglés, *Forkhead box class O*) es una familia de factores de transcripción claves en la regulación del destino celular (Malik y Storey 2011). Se encuentran controlando procesos fundamentales tales como el metabolismo celular, ciclo celular, respuesta al estrés y apoptosis (Glauser y Schlegel, 2007; van der Horst y Burgering, 2007; Salih y Brunet, 2008). En mamíferos se han descrito cuatro genes que codifican para proteínas de la familia FoxO: FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6. Los tres primeros (FoxO1, FoxO3 y FoxO4) son los principales sustratos de Akt. La fosforilación en respuesta a factores de crecimiento y a insulina reduce la afinidad de unión de FoxO a ADN, promoviendo la exportación de FoxO desde el núcleo hasta el citoplasma y aumentando su degradación (Salih y Brunet, 2008).

FoxO puede ser regulado por otras quinasas, como JNK (del inglés, *jun N-terminal kinase*), activada en presencia de estrés oxidativo. Se ha podido observar que en presencia de estrés oxidativo FoxO1 es activado por esta vía induciendo un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes como son MnSOD y catalasa (Malik y Storey, 2011). Además de la fosforilación, los miembros de la familia FoxO también pueden ser regulados por otros procesos como son la acetilación o la ubiquitinización, que desempeñarían un papel importante en la localización subcelular de FoxO y en su habilidad de unión por el ADN (van der Horst y Burgering, 2007). El papel de FoxO en la senescencia celular fue descrito en células de melanoma BRAF (V600E) donde ROS y JNK activan la expresión de p21 dependiente de FoxO (Figura 9) (de Keizer et al., 2010).

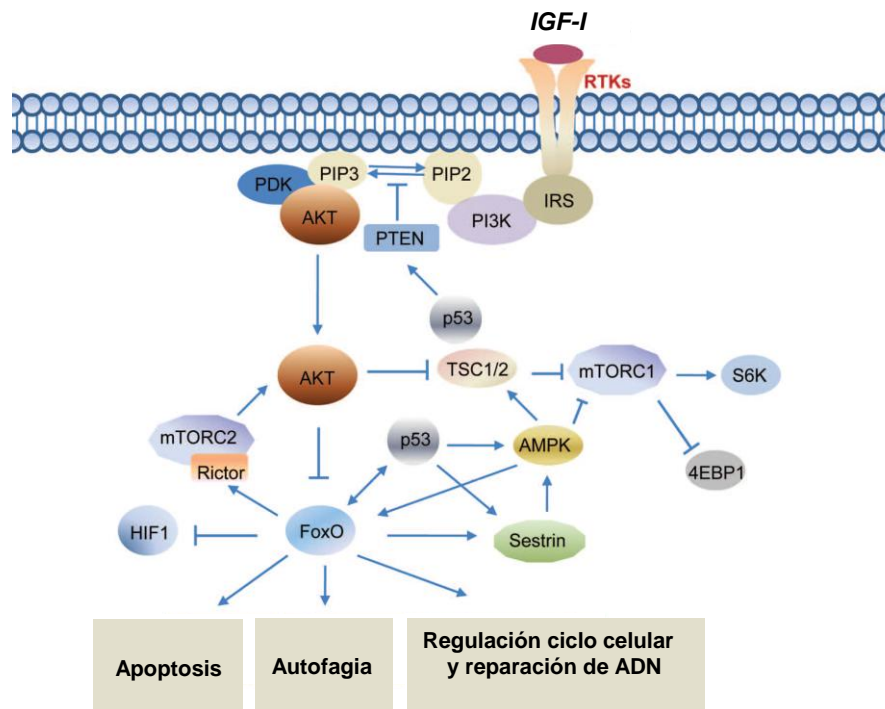


Figura 9. Vías RTK-PI3K-AKT-mTOR y FoxO. El eje de regulación PI3K-PTEN-Akt, y tanto mTOR como FoxO son reguladores críticos para el metabolismo celular, apoptosis y proliferación. Tras activación de receptores treonina quinasa (RTK), el incremento de PIP3 permite la activación de Akt y la fosforilación de sus numerosos substratos incluyendo FoxO. En su forma activa, FoxO activa dianas envueltas en el ciclo celular y apoptosis, inhibe la acción de HIF1 y funcionalmente interactúa con p53. Tanto p53 como FoxO regulan mTORC1 por regulación de AMPK. La elevación de Rictor por FoxO incrementa la expresión de mTORC2 y su actividad, el cual a su vez activa a Akt. Fuente: Zhang et al., 2011.

2.1.4 mTOR (MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN):

mTOR es una serina/treonina quinasa implicada en la regulación de la proliferación celular, ciclo celular, motilidad, supervivencia y síntesis de proteínas, perteneciente a la familia de las proteínas relacionadas con PI3K (del inglés, *phosphatidylinositol 3-kinase*). Cuando mTOR se encuentra hiperactivado, las células pierden la capacidad de responder a estímulos de crecimiento extracelulares y entran en senescencia (Blagosklonny, 2011). Ni la hiperproliferación ni la respuesta a daño al ADN son necesarias para que se produzca senescencia en este contexto. De hecho, esta es mediado a través de la activación de p53 dependiente de mTOR (Alimonti et al., 2010). FoxOs

antagoniza la actividad de mTORC1 y negativamente regula la progresión del ciclo celular durante el estrés celular (Zhang et al., 2011).

2.1.5 FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO (IGF-I).

El factor de crecimiento insulínico (IGF-I; del inglés, *Insulin-like growth factor I*) es una hormona polipeptídica de 70 aminoácidos con efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos (Puche y Castilla-Cortazar, 2012). Se sintetiza en el hígado bajo la influencia de la hormona del crecimiento (GH, del inglés, *growth hormone*), siendo el mayor promotor del crecimiento postnatal. Al ser una hormona con un amplio rango de funciones fisiológicas, sus niveles deben ser estrictamente controlados. La mayoría de sus acciones son mediadas a través de la unión de IGF-I a su receptor IGF-IR. IGF-IR es una tirosina quinasa activadora de la vía de Akt, involucrando otras vías como mTOR, MAPK, GSK-3 β , FoxO, etc...(Figura 9), que están estrechamente relacionadas con la supervivencia celular, crecimiento y proliferación (LeRoith et al., 1995; Chitnis et al., 2008, Annenkov, 2009). Estudios realizados en *Caenorhabditis elegans*, han mostrado que mutaciones que disminuyen la actividad de daf-2, gen que codifica para un receptor homólogo a IGF-IR, dan lugar a animales con el doble de esperanza de vida (Kimura et al., 1997). El ratón deficiente en IGF-IR es más longevo y presenta mayor resistencia a estrés oxidativo (Holzenberger et al., 2003).

Los niveles circulantes de GH e IGF-I son máximos durante la pubertad y la edad adulta temprana, sin embargo estos disminuyen de forma progresiva con la edad. La secreción reducida de GH/IGF-I en los ancianos se cree que contribuye a muchos síntomas del envejecimiento, incluyendo la pérdida de masa muscular, reducción de la densidad mineral ósea, disminución de los niveles de energía, etc...(Puche y Castilla-Cortazar, 2012).

2.1.6 RESTRICCIÓN CALÓRICA.

La posibilidad de que la esperanza de vida en mamíferos pudiera ser significativamente aumentada por modificaciones en la dieta fue demostrada en

1935 por un estudio en roedores publicado por McCay y colaboradores (McCay, 1935). La restricción calórica (RC) consiste en la disminución de la ingesta de calorías de un 10 a un 30% en la dieta. Esta disminución en la ingesta energética mejora la salud y retrasa el envejecimiento en muchos eucariotas. En mamíferos superiores, la RC retrasa la aparición de muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento como son cáncer, diabetes, arterioesclerosis, enfermedad cardiovascular y enfermedades neurodegenerativas (Roth et al., 2001; Fontana et al., 2004; Colman et al., 2009).

La RC contrarresta los cambios asociados al envejecimiento por modulación de las vías de señalización de IGF-I/insulina, mTOR, expresión de adiponectina, metilación de ADN y acetilación y desacetilación de histonas (Ribaric, 2012). Se ha observado que la RC disminuye los niveles en sangre de IGF-I en roedores (Huffman et al., 2008). También se ha observado que estimula la expresión de la desacetilasa NAD-dependiente, la sirtuina 1 (SIRT1). SIRT1 produce la desacetilación de FoxO3a, favoreciendo su translocación al núcleo; generando un efecto positivo por la reducción en la producción de ROS (Anderson et al., 2009).

2.1.7 PROTEÍNA RAS.

Las proteínas Ras forman parte de una familia de proteínas G monoméricas de bajo peso molecular que activan numerosas vías de señalización implicadas en proliferación y supervivencia celular. Presenta actividad reguladora GTP-hidrolasa, que alternando dos conformaciones estructurales:

1. Una forma activada, donde la proteína Ras está unida al guanosín trifosfato (GTP), llamada Ras-GTP.
2. Otra forma inactivada, donde la proteína Ras está unida al guanosín difosfato (GDP), llamada Ras-GDP.

La proteína Ras se activa por diferentes factores de intercambio de nucleótidos de guanina, (GEF, del inglés *Guanine-nucleotide Exchange Factor*), como CDC25, SOS1 y SOS2, SDC25 en levaduras. En mamíferos se conocen cuatro subfamilias de factores de intercambio para Ras: SOS, Ras-GRF, Ras-GRP y CN-RasGEF (Figura 10).

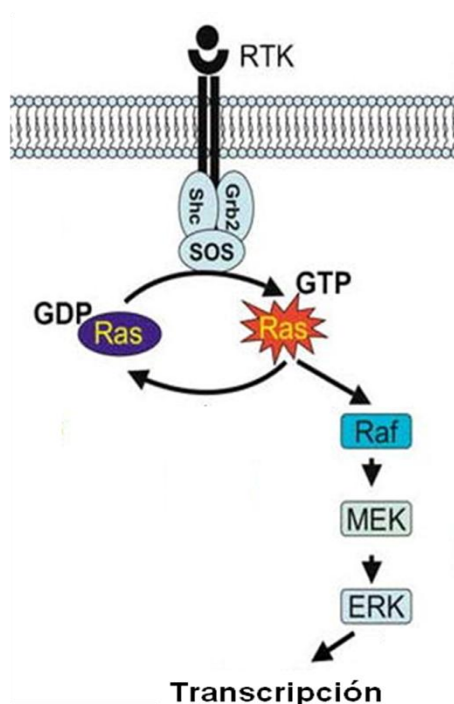


Figura 10. Esquema de la activación y la vía de señalización de Ras. Ras activo se une a Raf a través de su dominio de unión RBD (del inglés; Ras-binding domain) activándolo. Raf activo fosforila a la MEK1 y MEK2, que fosforila a su vez a Erk1 y 2. Erk1/2 fosforilado se dimeriza y se transloca al núcleo donde activa la expresión de genes implicados en la regulación del ciclo celular. Fuente: Le y Parada, 2007.

Las mutaciones en la familia de los proto-oncogenes Ras, que comprende H-Ras, N-Ras y K-Ras, son muy frecuentes, encontrándose entre el 20 y el 30 % de todos los cánceres humanos. Alrededor del 20% de todos los tumores humanos son debidos a mutaciones en el oncogén K-Ras. Sin embargo, se ha hecho evidente que el oncogén K-Ras en las células primarias también provoca senescencia celular por regulación de las vías RAF/MEK1/ERK1/2 y PI3K/Akt (Lin et al., 1998, Chen et al., 2005, Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007).

Por otro lado se ha observado que el oncogén H-Ras constitutivamente activado induce senescencia prematura en cultivos de fibroblastos debido a la activación de la respuesta celular de daño al ADN (DDR) (Di Micco et al., 2006; Bartek y Lukas, 2007). Se ha mostrado que la senescencia inducida por Ras puede ser dependiente a la producción de ROS (Lee et al., 1999), sin embargo un estudio reciente muestra que en fibroblastos humanos que expresan H-Ras la

senescencia es debida a un desequilibrio redox causado principalmente por el agotamiento de la capacidad antioxidante total y no por un fuerte aumento en la producción de ROS (Armeni et al., 2012).

3. HIPERFOSFATEMIA COMO INDUCTORA DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR.

El fósforo es un mineral importante que se incorpora con la dieta y se encuentra en el organismo asociado con el oxígeno en forma de fosfato. El mantenimiento del fosfato sérico en rangos fisiológicos es crítico para muchos procesos biológicos. Los niveles normales de fosfato en suero oscilan en adultos entre 2,5 y 4,5 mg/dL, y en niños entre 4 y 7 mg/dL. El fosfato inorgánico es un componente esencial de huesos, ácidos nucleicos y membranas celulares. Juega un papel crucial en el metabolismo energético celular (producción de ATP) y señalización intracelular por fosforilación de proteínas. El fosfato también actúa como un importante tampón acido-base en orina y sangre (Gattineni y Baum, 2012).

La hiperfosfatemia es un trastorno hidroelectrolítico en el cual hay un nivel anormalmente elevado de fosfato en sangre. A menudo se suele acompañar de niveles bajos de calcio (hipocalcemia) debido a la precipitación del fosfato con el calcio en los tejidos. La hiperfosfatemia se ha asociado en la patofisiología de distintas enfermedades tales como las enfermedades óseas, la calcificación vascular y la enfermedad renal crónica entre otras.

Aunque se conoce poco sobre los efectos directos del fosfato en el envejecimiento, se ha demostrado que el fosfato tiene un impacto significativo sobre el metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo, afectando potencialmente a procesos de envejecimiento en distintos organismos (desde levaduras hasta humanos). En un estudio de fisiología comparada se ha podido observar que existe una correlación inversa entre la longevidad y los niveles de fosfato en suero de mamíferos (Shiizaki y Kuro-o, 2012) (Figura 11).

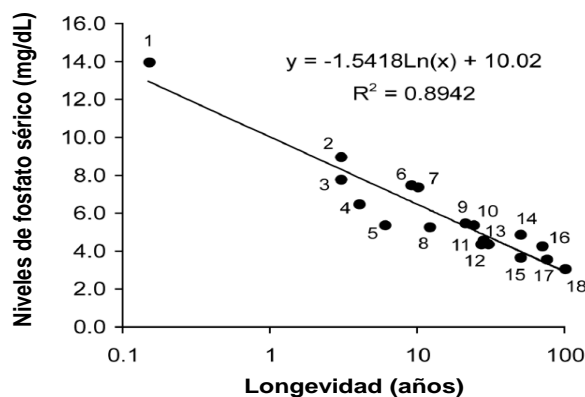


Figura 11. Relación entre los niveles de fosfato y la longevidad en mamíferos. 1: ratón Klotho -/-, 2: ratón, 3: rata, 4: hámster, 5: gerbil, 6: nutria, 7: conejo, 8: cerdo, 9: oveja, 10: ardilla, 11: puerco espín, 12: rata topo, 13: zorro volador, 14: oso, 15: rinoceronte, 16: elefante, 17: humano, 18: humano centenario. Fuente: Kuro-o, 2010.

3.1 HOMEOSTASIS DEL FOSFATO.

Existen numerosas evidencias que sugieren que la absorción del fosfato depende en general de una familia de transportadores de fosfato dependientes de sodio denominados SLC34 (del inglés, *solute carrier family*). Existen tres tipos de transportadores SLC34:

- 1) NaPi2a: SLC34A1, Npt2a, NaPII2a.
- 2) NaPi2b: SLC34A2, Npt2b, NaPII2b.
- 3) NaPi2c: SLC34AC, Npt2c, NaPII2c.

El fosfato se absorbe desde el tracto gastrointestinal a través de la ruta transcelular y a través de la vía paracelular. La absorción de fosfato transcelular es un proceso activo mediado por el transportador NaPi2b, que se encuentra regulado principalmente por la vitamina D, la acidosis metabólica y el fosfato ingerido en la dieta (Danisi et al., 1980; Hilfiker et al., 1998; Hattenhauer et al., 1999). La vía paracelular es un proceso de difusión no saturable en el cual el transporte de fosfato incrementa en función del incremento de la ingesta de fosfato en la dieta (Alizadeh Naderi y Reilly, 2010). Una vez que el fosfato entra en la circulación sistémica, el fosfato libre y el fosfato que se encuentra formando complejos se filtra en el glomérulo. Bajo condiciones basales, del 80-90% de la carga filtrada de fosfato es reabsorbido por el riñón, principalmente por el túbulo proximal a través de los transportadores NaPi2a y NaPi2c, que se encuentran en la membrana del borde en cepillo de la célula (Virkki et al., 2007). Los principales

reguladores de NaPi2a y NaPi2c son el fosfato de la dieta, la hormona paratiroidea (PTH) y FGF23 (Segawa et al., 2009).

Recientemente se ha descrito otra familia de transportadores SLC implicada en la homeostásis del fosfato, SLC20. Estas proteínas fueron identificadas inicialmente como receptores virales pero actualmente se han identificado como cotransportadores dependientes de sodio, NaPiIII: Pit-1 y Pit-2. Estos transportadores se han visto presentes en células de túbulo proximal, células de músculo liso vasculares y células endoteliales. (Kavanaugh et al., 1994; Miller y Miller, 1994).

3.2 REGULACIÓN ENDOCRINA DEL FOSFATO.

Los niveles de fosfato en sangre se deben a un balance entre la absorción del fosfato ingerido en la dieta desde el intestino, la movilización del fosfato desde el hueso y su excreción desde el riñón a la orina (Schiavi y Kumar 2004).

Diversos factores endocrinos regulan el metabolismo del fosfato y del calcio, entre ellos encontramos la vitamina D, la PTH y FGF23. Estas tres hormonas se encuentran formando el eje endocrino *hueso-riñón-paratiroides* (Dusso, Brown et al. 2005) (Figura 12).

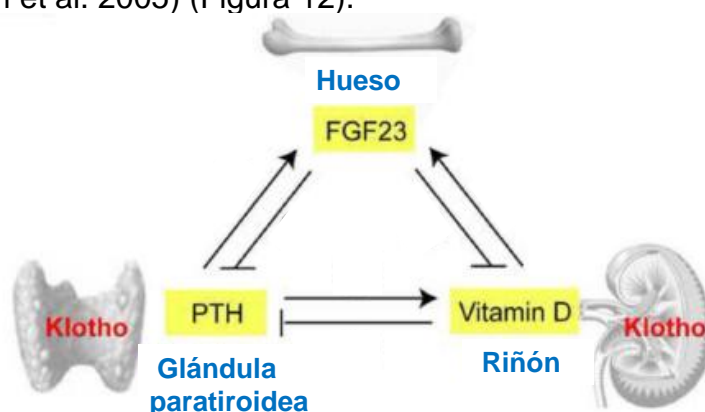


Figura 12. Regulación endocrina del metabolismo de fosfato. PTH incrementa la síntesis de vitamina D en el riñón. A su vez la vitamina D inhibe la secreción de PTH. El sistema FGF23-Klotho ha surgido como uno de los principales ejes endocrinos que regulan la homeostasis del fosfato. FGF23 se secreta en el hueso y actúa a nivel renal disminuyendo la síntesis de vitamina D, la cual a su vez incrementa la expresión de FGF23 en hueso. FGF23 también puede actuar sobre la glándula paratiroidea reduciendo PTH, que a su vez también incrementa la expresión de FGF23. Fuente: John et al., 2011.

3.2.1 VITAMINA D.

La vitamina D, calcitriol o antirraquítica es un heterolípido insaponificable del grupo de los esteroides. Es una provitamina soluble en grasas y se puede obtener de dos maneras:

- Mediante la ingesta de alimentos que contengan vitamina D, como por ejemplo la leche y el huevo.
- Por la transformación del colesterol o del ergosterol (propio de los vegetales) inducida por la exposición a los rayos solares UV.

La vitamina D es la encargada de regular el paso del calcio a los huesos, por ello el déficit de vitamina D produce debilidad ósea dando lugar a la producción de malformaciones irreversibles que conlleva al raquitismo en los niños y osteomalacia en los adultos.

La forma activa de la vitamina D (1,25-dihidroxitamina D₃) se sintetiza en el riñón y actúa a nivel de intestino donde aumenta la absorción del calcio y del fosfato ingerido en la dieta.

Por otro lado, la vitamina D induce la expresión de FGF23 en el hueso, incrementando los niveles de FGF23 en sangre. La forma activa de la vitamina D es capaz de unirse al receptor nuclear de la vitamina D (VDR) induciendo la heterodimerización con el receptor nuclear retinoide X (RXR). Este heterodímero funciona como un factor de transcripción que incrementa la expresión de FGF23 en osteocitos (Kuro-o, 2009) (Figura 12).

3.2.2 HORMONA PARATIROIDEA (PTH).

La paratohormona también denominada hormona paratiroidea (PTH) o paratrina es el principal regulador de la homeostasis del calcio. Es un polipéptido de 84 aminoácidos que presenta una vida media muy corta (2-4 minutos) (Saliba y El-Haddad, 2009)

La PTH se sintetiza y se secreta por la glándula paratiroidea en respuesta a cambios extracelulares en los niveles de calcio y los niveles de fosfato, que son

detectados gracias a la presencia de sensores (Felsenfeld et al., 2007). Entre estos sensores se encuentra el receptor de detección de calcio (CaSR; del inglés, *calcium-sensing receptor*), que es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) de 1.078 aminoácidos, que se expresa predominantemente en las paratiroides y los riñones. El CaSR permite la regulación de la secreción de hormona paratiroidea (PTH) y la reabsorción de calcio tubular renal en respuesta a las alteraciones en las concentraciones de calcio extracelulares (Thakker, 2012). La PTH actúa a nivel de hueso incrementando la reabsorción ósea de calcio y fósforo; y a nivel renal incrementando la síntesis de vitamina D, mediante la estimulación de la actividad de la enzima 1α -hidroxilasa, favoreciendo la reabsorción de calcio y el fósforo desde el intestino. La vitamina D a su vez es capaz de suprimir la producción y la secreción de PTH.

3.2.2 FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 23, FGF23.

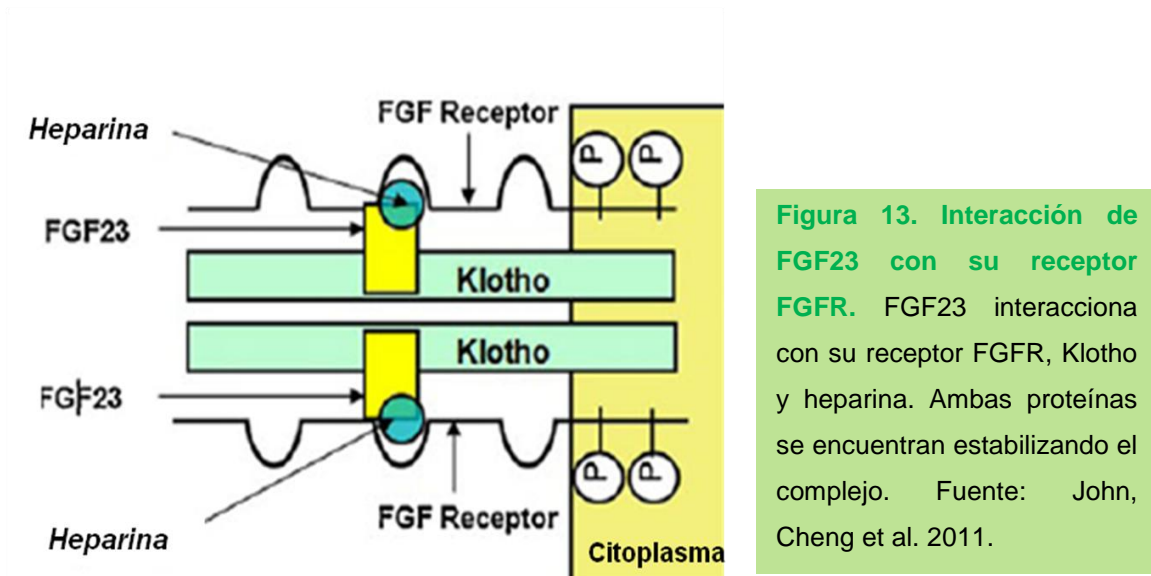
Otra hormona implicada en la regulación del metabolismo del fósforo es FGF23 (Kuro-o, 2006).

FGF23 pertenece a la superfamilia de ligandos FGF (factores de crecimiento de fibroblastos; del inglés, *fibroblast growth factor*). Existen tres tipos de FGF atípicos, que son: FGF19, FGF21 y FGF23, también conocidos como FGFs endocrinos ya que presentan función endocrina mientras que el resto de FGFs presentan una función principalmente paracrina y/o autocrina (Kuro-o, 2008). En general los ligandos FGF tienen alta afinidad por la heparina y los grupos heparan sulfato (HS), debido a que ellos muestran un conservado dominio de unión a HS. Las FGFs de acción endocrina presentan alteraciones en su dominio de unión a HS, impidiéndose la formación de enlaces de hidrógeno entre el HS y residuos de aminoácidos del dominio de unión a HS (Harmer et al., 2004, Goetz et al., 2007). Esta característica estructural reduce la afinidad de FGFs endocrinas a HS, permitiendo que se escapen de matrices extracelulares ricas en HS y entren al sistema circulatorio.

Los FGFs se unen a su receptor tirosina quinasa FGFR, que dimeriza tras la unión con FGFs. Los grupos HS participan en la interacción entre FGF-FGFR

y promueven la formación del complejo de señalización FGF-FGFR-HS (2:2:2), esencial para la eficiente activación del receptor FGFR (Plotnikov et al., 2000).

FGF23 presenta una baja afinidad por su receptor FGFR. La proteína Klotho forma un complejo binario constitutivo con FGFR, incrementando su afinidad por FGF23. Por tanto, Klotho funciona como un co-receptor obligado para FGF23 (Figura13) (Yoshida et al., 2002, Kurosu et al., 2006).



FGF23 es una hormona fosfatúrica, actúa en el riñón:

- 1) Induciendo la excreción de fosfato por reducción de la expresión y/o de la cantidad de transportadores NaPi2a en la célula tubular proximal, disminuyendo la absorción de fosfato a nivel renal.
- 2) Suprimiendo la síntesis de la vitamina D por reducción de la expresión del gen Cyp27b1 que codifica para la enzima 1 α -hidroxilasa, que transforma la forma inactiva de la vitamina D (25 hidroxivitamina D₃) en su forma activa (1,25 dihidroxivitamina D₃). También, por aumento de la expresión génica del gen Cyp24 que codifica para la enzima 24-hidroxilasa, que inactiva la vitamina D (Wang y Sun, 2009).

La disminución en los niveles de vitamina D en suero debido a la acción de FGF23 permite una reducción en la absorción de fosfato intestinal. Debido a que FGF23 no sólo funciona como hormona fosfatúrica sino también como hormona reguladora de los niveles de vitamina D, FGF23 induce un balance negativo del fosfato (Quarles, 2003, Liu et al., 2007) .

Además de la vitamina D, el aumento de los niveles plasmáticos de fosfato también aumentan la expresión de FGF23, aunque el mecanismo involucrado no ha sido determinado hasta la fecha (Wang y Sun 2009) (Figura 14).

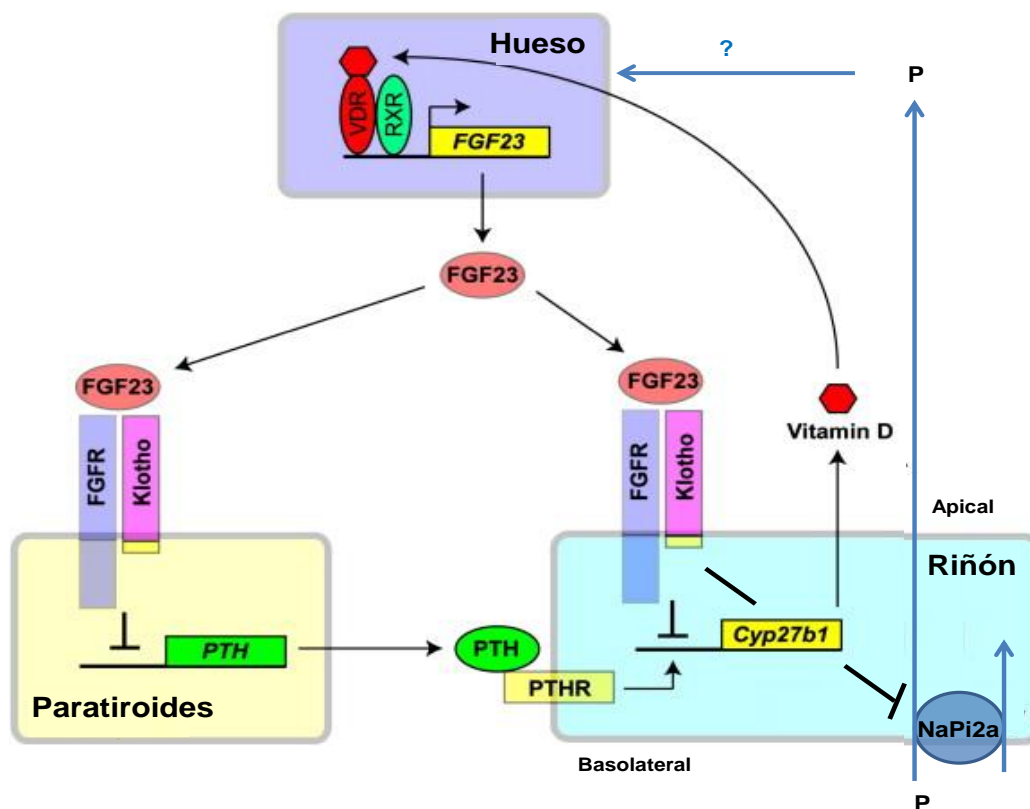


Figura 14. Eje endocrino riñón-hueso-paratiroides. El aumento de la fosfatemia y el aumento de vitamina D elevan la expresión de FGF23. Éste activa al receptor FGFR1 (colocalizado con Klotho) en la glándula paratiroides, inhibiendo la expresión de PTH, y en el riñón inhibiendo la expresión de Cyp27b1 y disminuyendo los niveles de NaPi2a. Esto lleva a la disminución de los niveles de vitamina D activa y un aumento de la fosfatemia, con descenso de la fosfatemia. Al descender la fosfatemia, disminuye la expresión de FGF23 del hueso.

3.3 EFECTO DEL FOSFATO EN EL FUNCIONAMIENTO CELULAR.

Alrededor del 20% del fosfato intracelular se encuentra presente en la mitocondria, donde influye en varias funciones celulares esenciales, incluyendo la fosforilación oxidativa, mientras que el 30% del fosfato celular total es almacenado en el retículo endoplasmático y es usado para la fosforilación de distintas proteínas (Hutson et al., 1992; Iotti et al., 1996; Gaasbeek y Meinders, 2005). El fosfato remanente se encuentra distribuido en otros compartimentos celulares como son el aparato de Golgi, el núcleo y los lisosomas. El fosfato inorgánico juega múltiples papeles en la regulación del estrés oxidativo y la función mitocondrial, tanto en la fisiología como en la patología, pudiendo afectar a los procesos de envejecimiento.

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), la concentración de NADPH y el consumo de oxígeno incrementan de forma hiperbólica en respuesta al incremento de la concentración de fosfato extra-mitocondrial (Bose et al., 2003). $\Delta\psi$ correlaciona positivamente con la producción de ROS por la cadena de transporte de electrones (Papa y Skulachev, 1997). Además, las altas concentraciones de fosfato aumentan la entrega del reductor equivalente a citocromo c en el Complejo III de la cadena de transporte de electrones, a través de la lanzadera glicerol fosfato, produciendo también un aumento de los niveles de ROS (Bose et al., 2003).

El fosfato inorgánico no solo aumenta los niveles de producción de ROS en la mitocondria, sino que también induce la transición permeable mitocondrial (la membrana interna se convierte en no selectivamente permeable a solutos pequeños), permitiendo por ejemplo la carga de Ca^{2+} mitocondrial que ocurre durante distintas patologías, incluyendo isquemia/reperfusión, que desencadena la muerte celular (Kowaltowski et al., 2001). El fosfato inorgánico juega múltiples papeles en la regulación del estrés oxidativo y la función mitocondrial, tanto en la fisiología como en la patología, pudiendo afectar a los procesos de envejecimiento.

3.4 PAPEL DEL FOSFATO EN EL ENVEJECIMIENTO.

Novedosos y recientes estudios han demostrado que defectos en el sistema FGF23-Klotho tienen como consecuencia una situación de hiperfosfatemia e hipervitaminosis D, como se ha podido observar en ratones mutantes para FGF23 o Klotho, cuya principal característica es la presencia de un fenotipo de envejecimiento. Estos datos sugieren que el fenotipo de envejecimiento que observamos en ambos modelos de ratón puede ser atribuido a la retención de fosfato y/o intoxicación de vitamina D (Kuro-o, 2011).

3.4.1 RATÓN DEFICIENTE EN KLOTHO.

El gen Klotho fue descubierto en 1997 como un gen mutado en una cepa de ratón que mostraba un fenotipo de envejecimiento y un acortamiento en la esperanza de vida (Kuro-o et al., 1997).

Los ratones Klotho ^{-/-} son casi indistinguibles de los Klotho ^{+/+} y Klotho ^{+/-} hasta las tres semanas de edad. A partir de ese momento los ratones Klotho ^{-/-} dejan de crecer, no presentan aumento de peso corporal y mueren prematuramente alrededor de las 8-9 semanas de edad. A pesar de que estos ratones presentan múltiples patologías similares al envejecimiento humano, la causa específica de la muerte no está clara, ya que ninguna de las patologías parece fatal por sí misma.

Dentro de las patologías que presenta el ratón deficiente en Klotho se observa entre otras hiperfosfatemia, hipervitaminosis D, hipogonadismo, retraso del crecimiento (Figura 15), involución tímica acelerada, piel atrofiada, sarcopenia, calcificación vascular, osteopenia, pulmón envejecido, resistencia a insulina, deterioro cognitivo (Nagai et al., 2003), pérdida de audición (Kamemori et al., 2002) y degeneración de las neuronas motoras (Anamizu et al., 2005).

Figura 15. Retraso del crecimiento del ratón Klotho ^{-/-}. Foto comparativa entre un ratón *wild type* (izquierda) y un ratón knockout para Klotho (derecha). La mutación del gen Klotho conduce a un síndrome que se asemeja al envejecimiento. Fuente: Kuro-o et al., 1997.



3.4.2 RATÓN DEFICIENTE EN FGF23.

FGF23 fue indentificado originalmente como un gen mutado en pacientes con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR, del inglés *autosomal dominant hypophosphatemic rickets*) (White et al., 2000). Los pacientes con ADHR presentan una mutación en el gen FGF23 que confiere resistencia a la inactivación proteolítica de la proteína FGF23, cuyos niveles se encuentran aumentados en sangre, lo que conlleva a una hipofosfatemia y a un defecto en la mineralización ósea. En contraste, mutaciones de pérdida de función de FGF23 causan hiperfosfatemia e hipervitaminosis D asociada con calcificación ectópica en varios tejidos blandos y en vasos sanguíneos, como se observa en los ratones knockout para FGF23 (FGF23^{-/-}) y pacientes con calcinosis tumoral familiar (Yu y White, 2005). El ratón deficiente en FGF23 desarrolla un fenotipo de envejecimiento casi idéntico al observado en los ratones deficientes en Klotho.

3.4.3 HIPERFOSFATEMIA Y ENVEJECIMIENTO.

Diversos estudios han descrito que el fenotipo de envejecimiento de ratones deficientes en Klotho y FGF23 puede ser revertido con éxito mediante la resolución de la hiperfosfatemia y/o hipervitaminosis D por medio de intervenciones dietéticas y genéticas.

Con el uso de una dieta deficiente en vitamina D se pudo revertir el fenotipo de envejecimiento en ratones Klotho^{-/-} (Tsujikawa et al., 2003) y FGF23^{-/-} (Stubbs et al., 2007). Del mismo modo, la alteración del gen del receptor de vitamina D (VDR) (Hesse et al., 2007) o del gen Cyp27b1 rescata estos ratones mutantes (Razzaque et al., 2006; Ohnishi et al., 2009). Estos datos sugieren que el exceso de actividad de vitamina D podría ser el responsable de los fenotipos de envejecimiento en ambos modelos. Sin embargo, estas intervenciones dietéticas y genéticas disminuyeron no sólo los niveles de vitamina D activa sino también los niveles de fosfato en sangre, aumentando la posibilidad de que el fosfato pudiera ser el verdadero responsable del fenotipo de envejecimiento. De hecho, cuando a los ratones se les administra una dieta baja en fosfatos se reducen los niveles de fosfato en sangre y se rescata a los ratones que carecen

de Klotho (Morishita et al., 2001) ó FGF23 (Stubbs et al., 2007) del fenotipo de envejecimiento, sin que se observe una disminución de los niveles de vitamina D en sangre. Del mismo modo, la limitación de la reabsorción de fosfato mediante la supresión del transportador NaPi2a en riñón redujo los niveles de fosfato en sangre y rescató a los ratones del fenotipo de envejecimiento (Ohnishi y Razzaque, 2010). Estas observaciones indican que la retención de fosfato puede ser la principal responsable del fenotipo de envejecimiento en modelos de ratón causados por defectos en el sistema FGF23-Klotho, mostrando una importante relación entre el envejecimiento y el fosfato.

La retención de fosfato conduce a patologías similares al envejecimiento, a las cuales se las ha denominado de forma colectiva como "fosfatopatias" (Kuro-o, 2011).

3.5 EFECTOS DE LA HIPERFOSFATEMIA SOBRE EL ORGANISMO.

Una de las principales consecuencias de la hiperfosfatemia a nivel del organismo es la aparición de calcificaciones vasculares. De forma inicial, se pudo observar que los altos niveles de fosfato en sangre constituían el factor de riesgo más importante en la aparición de enfermedades cardiovasculares y en la mortalidad de individuos con enfermedad renal crónica (Block et al., 2004; Kestenbaum et al., 2005). Estudios recientes han mostrado que la asociación entre las altas concentraciones de fosfato y la mortalidad no queda restringida solamente a personas con enfermedad renal, sino a la población en general. Así pues, se ha podido observar como la hiperfosfatemia se encuentra asociada con la calcificación coronaria en individuos sanos (Foley et al., 2009).

Por otro lado, la hiperfosfatemia causa disfunción endotelial, principal causa de la arterioesclerosis resultante en enfermedades cardiovasculares (ECV) (Ross, 1999). Sin embargo, el efecto de la hiperfosfatemia sobre la función de la célula endotelial y su influencia en el desarrollo de ECV es todavía desconocido. Experimentos *in vitro* han demostrado que la presencia de altas concentraciones de fosfato inhiben la producción de NO a través del incremento

en la producción de ROS y la inactivación de eNOS por la vía convencional de PKC, lo que provoca un deterioro de la vasodilatación dependiente de endotelio (Shuto et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que el aumento en la ingesta de fosfato conduce a un deterioro marcado de la función vascular de la célula endotelial, tanto en animales de experimentación como en hombres (Lau et al., 2011). Estos estudios podrían estar mostrando una relación entre la hiperfosfatemia, el envejecimiento prematuro y finalmente la muerte.

3.5.1 CALCIFICACIÓN VASCULAR.

La calcificación vascular consiste en la deposición inapropiada de fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ en las arterias. Es altamente prevalente en la enfermedad renal crónica (ERC), la arteriosclerosis, la diabetes y el envejecimiento normal. Según su ubicación, la calcificación vascular se pueden dividir en tres tipos: íntima, media y valvular (Lau et al., 2011). La deposición de productos calcio-fósforo en la capa íntima de los vasos sanguíneos se encuentra asociada a la aparición de placas ateroscleróticas, mientras que la deposición en la capa media está asociada con rigidez vascular y arterioesclerosis (Edmonds et al., 1982; Hunt et al., 2002).

La calcificación vascular inducida por fosfato se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* (Giachelli 2009). Se trata de un proceso complejo que no se debe solamente a la precipitación de productos calcio-fósforo de forma pasiva en la célula, sino también a un proceso celular activo que tiene lugar en las células de musculo liso vascular que son reprogramadas para convertirse en células de tipo osteoblasto. A este proceso se le conoce con el nombre de transdiferenciación osteogénica (Giachelli, 2009) y fue identificado originalmente en cultivos celulares y animales de experimentación, pero ha sido observado también en arterias humanas (Shroff et al., 2010).

Como resultado del proceso de calcificación vascular observamos (Figura 16):

- Transformación fenotípica de células musculares lisas vasculares (CML) a células de tipo osteocondrogénico.
- Estimulación de CML para sintetizar vesículas de matriz iniciadoras del proceso de mineralización de forma activa.
- Apoptosis de CML.
- Desequilibrio en la regulación de promotores e inhibidores de la mineralización.

3.5.2 EFECTOS DEL FOSFATO SOBRE LA CELULA DE MUSCULO LISO VASCULAR (CML).

La entrada del fosfato a la célula muscular lisa vascular está mediada por la presencia del transportador dependiente de sodio tipo III: Pit-1 y Pit-2 (Kavanaugh et al. 1994; Boyer et al., 1998).

Estudios *in vitro* han mostrado que cuando células CML son expuestas a altas concentraciones de fosfato inorgánico ($>2.4\text{mM}$; 1.6mM valor fisiológico) se induce de forma directa cambios fenotípicos en la célula: se transforman de un fenotipo contráctil a un fenotipo osteocondrogénico, pierden marcadores de músculo liso ($\text{SM}\alpha\text{-actina}$ y $\text{SM22}\alpha$) y sobreexpresan marcadores osteocondrogénicos (Runx2/Cbfa1 , osteopontina y fosfatasa alcalina) (Jono et al., 2000; Steitz et al., 2001) (Figura 16). Runx2/Cbfa1 es un factor de transcripción obligado en la diferenciación ósea ya que induce la expresión de los principales componentes de la matriz ósea, incluyendo colágeno de tipo I, osteocalcina y osteopontina.

Las CML humanas cultivadas en condiciones de hiperfosfatemia e hipercalcemia desarrollan cuerpos apoptóticos y liberan de vesículas derivadas de la membrana plasmática que tiene como resultado la calcificación de la matriz extracelular (Reynolds et al., 2004) (Figura 16). El mecanismo implicado en este proceso está relacionado con la disminución en la expresión del gen *Gas6* (del inglés, *Growth arrest-specific gen 6*), que ejerce su efecto anti-apoptótico a

través de la vía de señalización Bcl-2 vía PI3K-Akt. Bcl-2 fosforilado se inactiva permitiendo la activación de la proteína pro-apoptótica BAD, que activa a la caspasa 3, produciendo apoptosis (Son et al., 2007). Tanto Gas6 como su receptor Axl están disminuidos en células musculares lisas de aorta humana calcificadas por altos niveles de fosfato (Son et al., 2006).

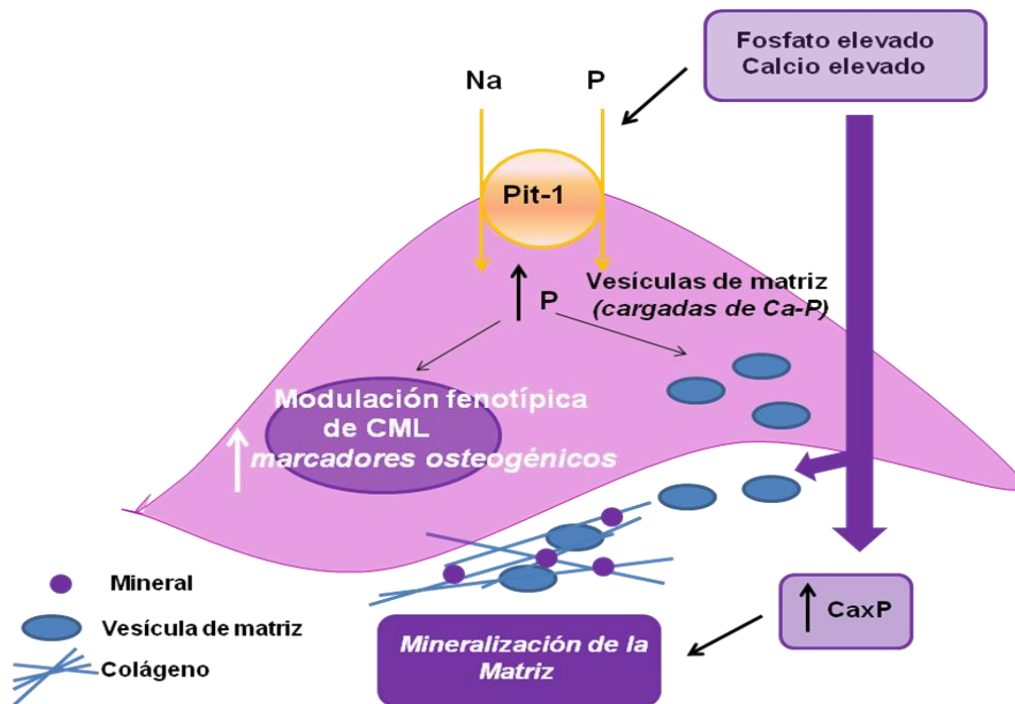


Figura 16. Esquema del proceso de calcificación vascular de una célula de músculo liso vascular. El fosfato extracelular entra a la célula vascular a partir del transportador Pit-1. Dentro de la célula induce cambio fenotípico y salida de vesículas de matriz cargadas de productos Ca-P a la matriz extracelular induciendo el proceso de mineralización. Fuente: Giachelli, 2009.

Las CML que sufren el proceso de reprogramación, para adaptarse a este nuevo medio hostil, secretan vesículas de matriz con el objetivo de evitar una sobrecarga de calcio. Las CML que no se diferencian entran en apoptosis, lo que también provoca la liberación de vesículas cargadas de calcio y la mineralización de la matriz extracelular. Ambas vías tienen como consecuencia la deposición de cristales de calcio-fósforo en la matriz extracelular, lo que aumenta el riesgo de que las CML supervivientes entren en apoptosis (Figura 16).

Se ha observado que la hiperfosfatemia puede inducir senescencia en CML, proceso que se encuentra asociado con la iniciación y la progresión del

proceso de calcificación. Este proceso de senescencia es dependiente de la vía p53/p21. Estudios *in vitro* han mostrado que esta vía de senescencia puede estar regulada por una proteína desacetilasa dependiente de NAD, SIRT1. SIRT1 media la desacetilación de p53, favoreciendo su degradación vía proteosoma. Por el contrario una caída de la actividad desacetilasa celular incrementa la vida media de p53 endógeno (Ito et al., 2001). El fosfato disminuye la expresión de SIRT1, incrementando los niveles de p53 acetilado estable, que induce senescencia a través de la expresión de p21 (Takemura et al., 2011).

3.6 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA HIPERFOSFATEMIA.

3.6.1 ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (ERC).

La enfermedad crónica renal (ERC) se define como un estado en donde se produce un progresivo deterioro de la función renal que puede durar meses o años debido a una enfermedad crónica que afecta al riñón, principalmente hipertensión, diabetes y/o por envejecimiento natural (Kuro-o, 2011).

Una de las marcas características del envejecimiento es el deterioro de las funciones fisiológicas de varios tejidos y sistemas orgánicos. Los riñones son muy susceptibles al envejecimiento, produciéndose daños estructurales y funcionales (Martin y Sheaff, 2007). Los principales daños estructurales que se observan en riñones envejecidos son la fibrosis intersticial, glomeruloesclerosis y atrofia tubular (Stubbs et al., 2007). La fibrosis renal es una patología común de riñones envejecidos y con ERC. La fibrosis parece ser debida a la respuesta inflamatoria que genera el riñón en respuesta al daño producido por causas como el estrés oxidativo que se genera durante el envejecimiento, hipertensión, diabetes y glomerulonefritis crónica (Thiery et al., 2009).

Los pacientes con ERC presentan una marcada disminución en la expresión de Klotho renal asociada a una resistencia a FGF23, hiperfosfatemia y calcificación vascular como ocurre en el ratón deficiente en Klotho (Koh et al., 2001; El-Abbadi y Giachelli, 2005; Gutierrez et al., 2008). Los pacientes con ERC también presentan síntomas típicos del envejecimiento como son el

hipogonadismo, atrofia de la piel, osteopenia y deterioro cognitivo. Debido a ello, la ERC puede considerarse como un estado acelerado de envejecimiento y/o como una enfermedad asociada a la edad con deficiencia de Klotho y retención de fosfato (Kuro-o, 2011).

Metabolismo del Fosfato en ECR.

Durante la ECR se pierden nefronas funcionales, que son requeridas para la correcta excreción del fosfato en la orina. Como mecanismo compensatorio se produce un incremento en los niveles de suero de FGF23. FGF23 suprime la síntesis de vitamina D en el riñón. La disminución de nefronas funcionales también contribuye a la disminución de la síntesis de vitamina D, disminuyendo la absorción de fosfato a nivel intestinal.

Este aumento en los niveles de FGF23 y la disminución de vitamina D mantienen los niveles de fosfato en sangre normales durante el estadio temprano de pacientes con ERC y preceden a la aparición de hiperfosfatemia (Gutierrez et al., 2005).

Debido a que la vitamina D es un potente inductor de Klotho (Tsujikawa et al., 2003), su disminución puede reducir la expresión de Klotho. Además, debido a su actuación como supresor de PTH (Dusso et al., 2005), su disminución puede incrementar PTH.

La disminución de los niveles de Klotho puede inducir resistencia a FGF23 en el riñón y la glándula paratiroidea. Además, el aumento de PTH tiene como consecuencia el incremento de FGF23 (Lavi-Moshayoff et al., 2010).

Estos cambios en las hormonas reguladoras del metabolismo del fosfato y de Klotho forman un bucle, en el que se observan elevados niveles de FGF23, PTH y bajos niveles de vitamina D y Klotho en pacientes de estadio final de enfermedad renal, que tiene como consecuencia una situación de hiperfosfatemia debido a fallos en la excreción del fosfato ingerido en la dieta (Figura 17).

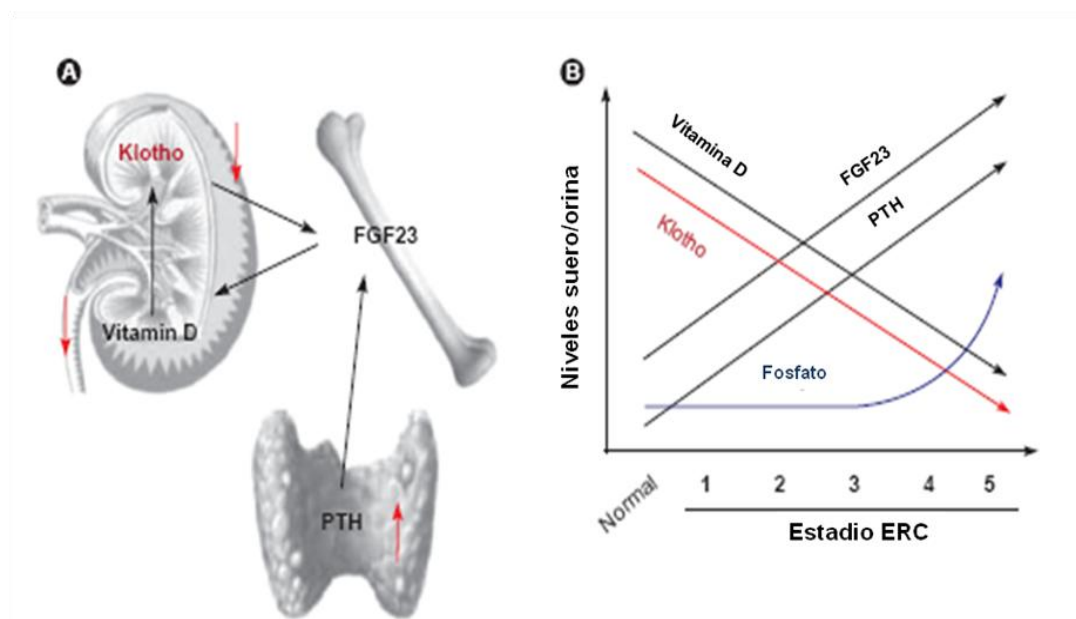


Figura 17. Cambios en el sistema endocrino regulador del fósforo durante la progresión de la ECR. A) Bucle que permite un aumento en los niveles de FGF23, PTH y una disminución de vitamina D y Klotho en la ERC. **B)** Incrementos en suero de los niveles de FGF23 y PTH, disminución en suero de vitamina D y en orina de Klotho preceden a la hiperfosfatemia durante la progresión de la ERC desde el estadio 1 hasta el 5. Fuente: Kuro-o, 2011

Desde que la hiperfosfatemia fue identificada como uno de los principales factores de riesgo en la mortalidad de pacientes con ERC (Ganesh et al., 2001; Gutierrez et al., 2005), ha sido considerada una importante diana terapéutica para el mantenimiento de los pacientes con ERC. La reducción de los niveles de fósforo en sangre por debajo de los 4.5mg/dL se puede lograr con una dieta baja en fósforo o mediante quelantes de fósforo (medicamentos capaces de quelar el fósforo en el intestino y prevenir su absorción) ha sido considerada una importante diana terapéutica para el mantenimiento de los pacientes con ERC.

3.6.2 HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO.

El hiperparatiroidismo es una alteración que consiste en una mayor secreción de PTH por parte de las glándulas paratiroides.

La hiperfosfatemia es la principal causa del hiperparatiroidismo secundario, complicación importante en la ECR (Saliba y El-Haddad, 2009). El fósforo se encuentra induciendo la secreción de PTH por tres mecanismos:

- Efecto estimulador directo sobre la glándula paratiroidea.
- Inducción de hipocalcemia por precipitación con el calcio.

- Estimulación de FGF23, que induce una disminución severa en los niveles de vitamina D. La disminución de los receptores de vitamina D sobre la glándula paratiroidea permite que se produzca una situación de resistencia a la vitamina D, lo que causa un aumento en los niveles de PTH.

El tratamiento y la diagnosis de la enfermedad son cruciales en el mantenimiento de los enfermos con ECR. Los niveles de PTH se ha visto que comienzan a aumentar a partir del estadio III de la ECR (Levin et al., 2007).

4. QUINASA LIGADA A INTEGRINAS (ILK).

La adhesión de las células a la matriz extraceular (ECM; del inglés, *extracellular matrix*) está mediada principalmente por receptores transmembrana heterodiméricos (α/β) llamados integrinas (Hannigan et al., 1996). Bajo activación, el dominio extracelular de la integrina se adhiere a la matriz extracelular por unión a numerosos ligandos como son la fibronectina y el fibrinógeno. Además para que las células se adhieran firmemente con la ECM, las integrinas deben conectar con el citoesqueleto de actina de la célula. Esta conexión es mediada por los complejos de adhesión focal (FA; del inglés, *focal adhesion*).

La quinasa ligada a integrinas (ILK; del inglés, *integrin linked kinase*) fue descubierta en 1996 en la búsqueda de proteínas capaces de interaccionar con el dominio citoplasmático de la subunidad β_1 de integrinas (Hannigan et al., 1996). Es una serina/treonina quinasa de 59 KDa que se encuentra localizada en las adhesiones focales. Estos sitios de adhesión son los principales centros de señalización intracelular, donde ILK juega un papel central en la transducción de muchas de las señales bioquímicas que son iniciadas por las interacciones matriz-célula y que regulan procesos fundamentales como son el crecimiento, proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis (Hannigan et al., 2005; Legate et al., 2006).

Análisis genéticos y genómicos han establecido que ILK es una de las pocas proteínas evolutivamente conservadas en el acoplamiento de las integrinas y la actina (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002; Sakai et al., 2003). Su desregulación se ha relacionado con enfermedades como el fallo cardíaco (Bendig et al., 2006) y cáncer (Tan et al., 2004).

4.1 ESTRUCTURA E INTERACCIONES DE ILK.

ILK tiene una estructura tripartita en la que se basa su capacidad multifuncional (Figura 18). Presenta un dominio N-terminal que contiene cuatro repeticiones de anquirina (ANK), un dominio central de homología a la plecstrina (PH; del inglés, *Pleckstrin homology*) y un dominio C-terminal quinasa (McDonald et al., 2008).

La anquirina de la región N-terminal se une a PINCH, también conocida como LIMS1. Actualmente se conocen dos tipos de proteínas PINCH: PINCH-1 (Rearden, 1994) y PINCH-2 (Zhang et al., 2002), codificadas por dos genes diferentes muy similares (en humanos presentan una homología del 82% en su secuencia de aminoácidos) (Zhang et al., 2002).

PINCH es una proteína adaptadora que está constituida por cinco dominios LIM. Forma un complejo con ILK en el citoplasma antes del reclutamiento de ILK por los sitios FA (Zhang et al., 2002). ILK también se une a través de su extremo N-terminal a la proteína asociada a ILK (ILKAP; del inglés, *ILK-associated protein*), fosfatasa perteneciente a la familia de las fosfatasa 2C (PP2C) que regula negativamente la señal de ILK (Leung-Hagesteijn et al., 2001; Kumar et al., 2004).

PINCH a su vez se encuentra unida a través de su cuarto dominio LIM₄ a la proteína adaptadora Nck-2 (Tu et al., 1998), la cual es capaz de unirse a través de su dominio SH2 a receptores tirosina quinasa como son el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR; del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*) o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR; del inglés, *Platelet-derived Growth Factor Receptor*).

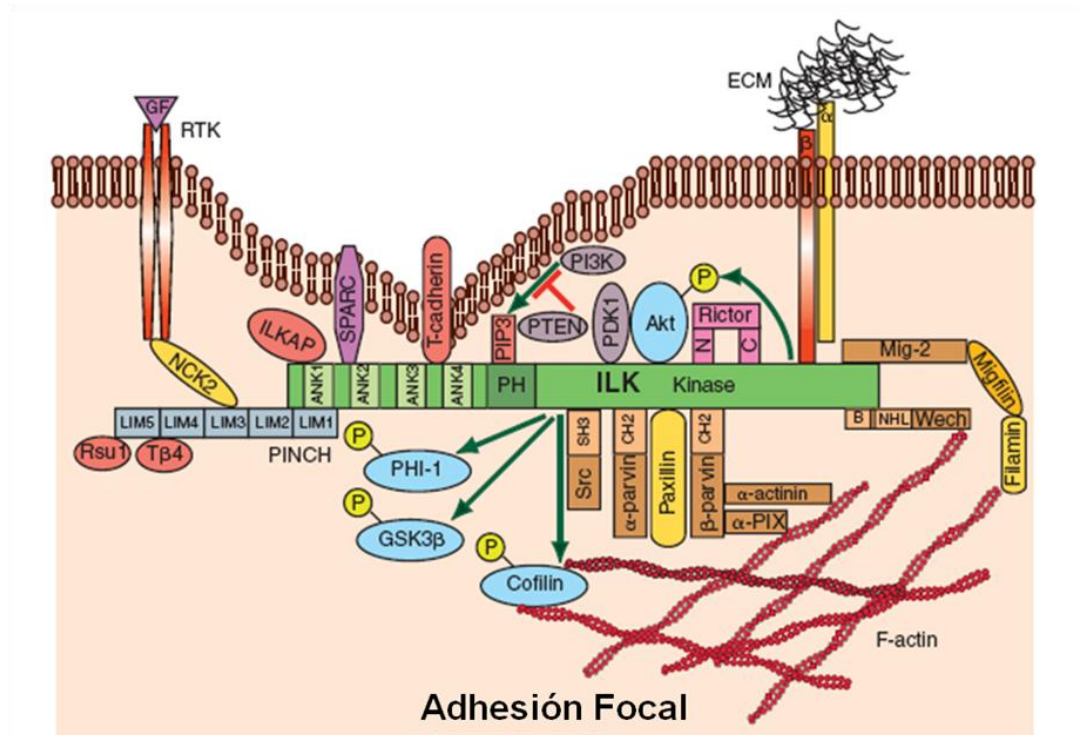


Figura 18. Esquema de la estructura de ILK y sus distintas interacciones. ILK se encuentra localizado en FA, donde forma un complejo multiproteico con numerosas proteínas que están envueltas en cascadas de señalización celular. Fuente: McDonald et al., 2008.

El dominio central PH presenta como ligando fisiológico el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Hannigan et al., 2005). El dominio C-terminal además de su función catalítica es capaz de interactuar con integrinas (integrina β_1) así como con proteínas de FA como son la paxilina (Nikolopoulos y Turner, 2002) que unen ILK, y por tanto las integrinas, con la actina del citoesqueleto.

ILK se une también a proteínas de la familia de las parvinas que incluye tres miembros: α , β y γ -parvina y se caracterizan por presentar un polipéptido estirado N-terminal seguido de dos dominios de homología a la calponina (CH), de los cuales el segundo es el que media la interacción de la proteína con ILK (Tu et al., 2001).

A través de su dominio C-terminal, ILK también se une a la proteína Mig-2, proteína adaptadora que favorece la unión de ILK con la actina del citoesqueleto, formando un puente en el hueco existente entre ambas (Larjava et al., 2008). PINCH, ILK y parvina se encuentran formando un complejo ternario en las células, denominado IPP (*ILK-PICH-Parvin*) (Wu, 2001).

4.2 ILK Y SEÑALIZACIÓN CELULAR.

ILK juega un papel central en la regulación de transducción de señales celulares y funciona como un eje alrededor del cual se centralizan muchas vías de señalización (Figura 19). La actividad quinasa de ILK es estimulada por integrinas y mediadores solubles, incluyendo factores de crecimiento y citoquinas (Delcommenne et al., 1998; Li et al., 2003; Xie et al., 2004; Rosano et al., 2006; Imanishi et al., 2007). ILK se regula de manera dependiente de PI3K (Delcommenne et al., 1998). La expresión de ILK también se induce en condiciones de hipoxia (Abboud et al., 2007).

La actividad de ILK es antagonizada por fosfatasas tales como la ILKPA (Kumar et al., 2004) y la fosfatasa supresora de tumores (PTEN; del inglés, *Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on the Chromosome 10*) (Persad et al., 2001).

Tras su activación, ILK ejerce control sobre diversos efectores que modulan funciones celulares cruciales (Figura 19). Particularmente, se ha demostrado que ILK regula la fosforilación de Akt en su serina 473 (Ser-473) y de GSK-3 β en su serina 9 (Ser-9) en varios tipos celulares (Delcommenne et al., 1998; Guo et al., 2007).

La fosforilación de Akt en su Ser-473 es dependiente de PI3K. Esta fosforilación es requerida para su completa activación junto con la fosforilación en su treonina 308, la cual es llevada a cabo por la quinasa 3-fosfoinositol dependiente (PDK₁; del inglés, *PI 3-kinase-dependent Kinase-1*) (Dillon et al., 2007). A través de la fosforilación de Akt, ILK estimula vías de señalización implicadas en la supervivencia celular como activación de caspasas y la estimulación del factor nuclear B (NF- κ B) (Hannigan et al., 2005).

La fosforilación de Akt a través de ILK es facilitada por Rictor, miembro del complejo mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) que se encuentra interactuando de forma directa con ILK, y cuya depleción junto con la de ILK (mediante el uso de ARNs de interferencia) resulta en una disminución de la fosforilación de Akt en su Ser-473 y la inducción de apoptosis (Sarbasov et al., 2004).

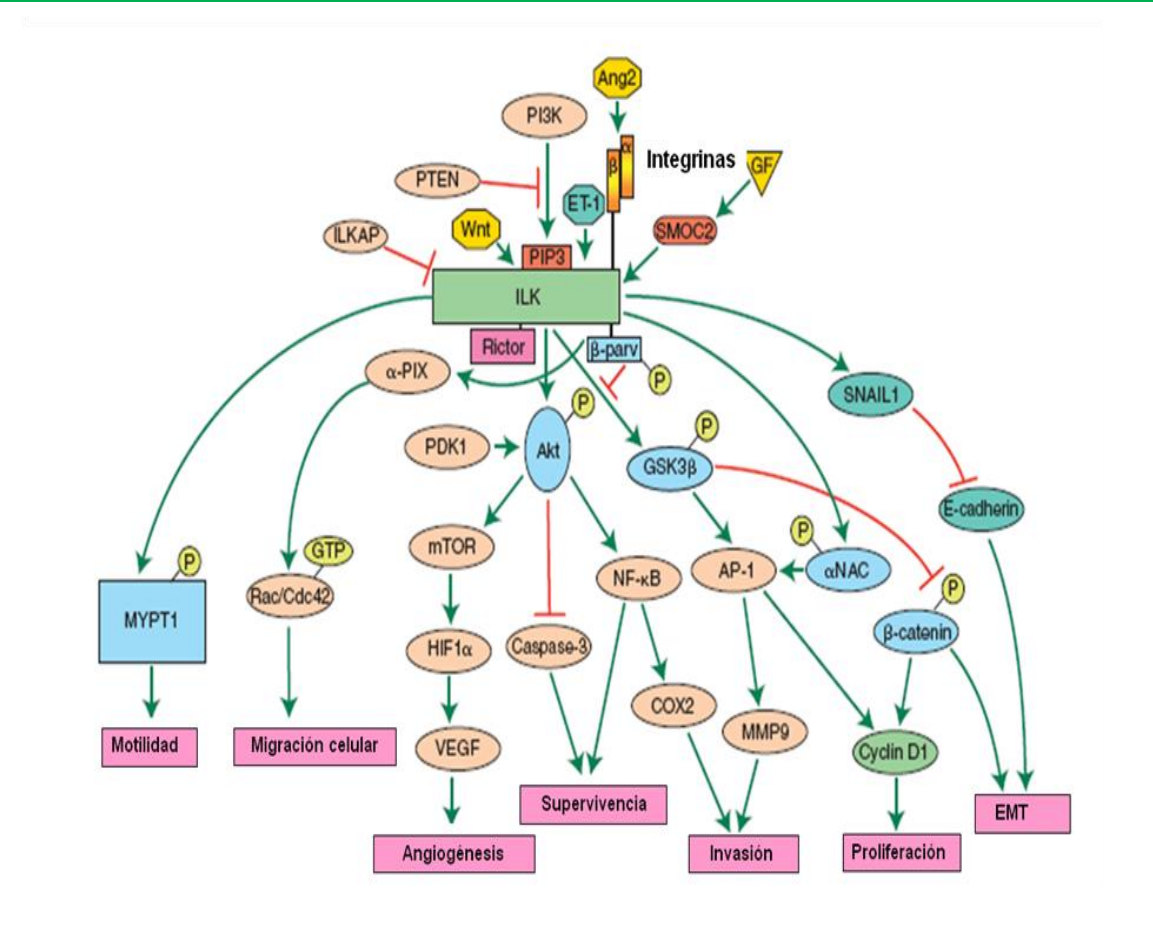


Figura 19. Vías de señalización reguladas por ILK. La activación de ILK por integrinas y mediadores solubles resulta en la regulación de efectores que modulan procesos como supervivencia, EMT, proliferación, etc...La actividad de ILK es antagonizada por ILKAP y PTEN. Ang2, angiopoyetina 2; GF, factor de crecimiento; SPARC, proteína ácida secretada y rica en cisteína; SMOG2 proteína secretada modular de unión a calcio 2; ET-1, endotelina 1; HIF-1, factor inducible por hipoxia. Fuente: McDonald et al., 2008.

ILK también se encuentra fosforilando a GSK-3 β en su serina 9, inactivándola. La fosforilación de GSK-3 β regula vías que permiten la activación de la proteína activadora 1 (AP1; del inglés, *activator protein*) y factores de transcripción como son la β -catenina y Lef/Tcf (*Lymphoid Enhancer Factor/T cell Factor*), los cuales estimulan a su vez a la metaloproteasa de matriz 9 (MMP9; del inglés, *matrix metalloprotease 9*) y a ciclina D, respectivamente, regulando procesos de proliferación (Hannigan et al., 2005). ILK también fosforila a NAC, un coactivador transcripcional de AP1 (Quelo et al., 2004).

ILK puede modular la propagación celular, la migración y la reorganización del citoesqueleto por activación del factor de intercambio interactivo-PAK (PIK;

del inglés, *PAK-interactive exchange factor*, también conocido como ARHGEF6) y por el factor de intercambio de nucleótidos-guanina (GEF; del inglés, *guanine-nucleotide exchange factor*) a través de Rac1, Cdc42 (Filipenko et al., 2005), y por activación de la proteína cofilina a través de la interacción con Src fosforilada (Kim et al., 2008).

Se ha descrito que altos niveles de expresión de ILK suprimen la expresión de E-cadherina, debido a la estimulación de su represor, Snail, promoviendo así la transición epitelio mesénquima (EMT; del inglés, *epithelial-to-mesenchymal transition*) permitiendo invasión y metástasis (Barbera et al., 2004).

4.3 PAPEL DE ILK EN LA FISIOLÓGIA Y DESARROLLO NORMAL DE LOS TEJIDOS.

Estudios basados en la pérdida de expresión y actividad de ILK a nivel de distintos organismos han demostrado como la función de ILK es necesaria para el desarrollo en eucariotas. En invertebrados, experimentos genéticos de eliminación de la expresión de ILK muestran como ésta es requerida para el reclutamiento de filamentos de actina a la membrana plasmática en puntos de unión en músculo (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002). En vertebrados la pérdida de función de ILK ha subrayado la importancia de ILK en las interacciones proteína-proteína relacionadas con el dinamismo del citoesqueleto, proporcionando un eje para la activación de distintas vías de señalización (Sakai et al., 2003; Yasunaga et al., 2005; Bendig et al., 2006; Knoll et al., 2007).

La delección de ILK en *Xenopus laevis* (Yasunaga et al., 2005) y en modelos de ratón (Sakai et al., 2003) resulta letal durante el desarrollo embrionario debido a defectos en mecanismos de adhesión y migración. En el pez cebra la interrupción de la unión entre ILK y parvina reduce la actividad de ILK, produciendo muerte del embrión debido a un fallo cardíaco (Bendig et al., 2006). Estas evidencias sostienen la idea de la necesidad fisiológica de la función adaptadora y quinasa de ILK.

Las principales funciones de ILK en la mayor parte de los tejidos y/o sistemas orgánicos quedan resumidas en Tabla 1 (McDonald et al., 2008)

Tejido	Funciones de ILK	Patologías implicadas del <i>knockout</i> de ILK
Hueso (<i>condrocitos</i>)	Proliferación y adhesión	Enanismo
Piel (<i>queratinocitos</i>)	Proliferación, adhesión y migración	Ampollas en la piel Inhibición del desarrollo del folículo piloso
Musculo esquelético	Adhesión y diferenciación de mioblastos	Distrofia muscular
Musculo liso	Contractibilidad, adhesión y dinamismo del citoesqueleto	Desconocida
Riñón (<i>celula tubular y podocito</i>)	Adhesión y EMT	Fibrosis, proteinuria
Hígado (<i>hepatocitos</i>)	Diferenciación y supervivencia	Hepatitis
Sistema Nervioso Central	Adhesión, migración y polaridad, proliferación y supervivencia	Lisencefalia
Sistema Inmune (<i>células T y macrófagos</i>)	Adhesión, migración, proliferación y supervivencia	Desconocido
Sistema Cardiovascular (<i>células endoteliales y cardiomiocitos</i>)	Invasión, migración, proliferación y supervivencia	Cardiomiopatía dilatada

Tabla 1. Funciones de ILK en los tejidos

4.3.1 EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE ILK EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

En CMLs, ILK se encuentra localizada en los miofilamentos y promueve la contracción celular por fosforilación directa de la cadena ligera de miosina (MLC;

del inglés, *myosin light chain*) o por acción sobre la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP; del inglés, *myosin light chain phosphatase*) (Deng et al., 2001). Alternativamente, ILK puede activar la contracción de CML de forma indirecta por la activación de inhibidores de MLCP como son el CPI-17 y PHI-1 (Deng et al., 2002). Por tanto, ILK ha sido indentificada como un regulador clave en la contractibilidad de cardiomiocitos (Hannigan et al., 2007).

Basándose en estudios de modelos de daño vascular que mimetizan los eventos celulares que tienen lugar en la enfermedad vascular oclusiva, se ha propuesto que la ILK actúa manteniendo a las CML en un fenotipo contráctil en la arteria normal. En condiciones de daño arterial, la disminución de los niveles de ILK facilita la reorganización de las adhesiones focales y la actina del citoesqueleto, permitiendo una migración más eficiente de CMLs y proliferación para establecer el engrosamiento de la neointima (Ho y Bendeck, 2009).

4.4 IMPOTARCIA DE ILK EN DISTINTOS PROCESOS PATOLÓGICOS.

4.4.1 PAPEL DE ILK EN CANCER.

Cuando se delecciona ILK se pueden observar defectos significativos en el desarrollo normal y homeostasis de los tejidos. Por el contrario, la sobreexpresión o activación constitutiva de ILK tanto en cultivo celular como en modelos de ratón transgénicos tiene como resultado una progresión oncogénica (Hannigan et al., 2005; Legate et al., 2006; Dillon et al., 2007). El motivo por el cual se produce un aumento en la expresión de ILK permanece desconocido y puede variar dependiendo el tipo de tumor. Diversas evidencias sugieren que la capacidad oncogénica de ILK deriva de la regulación por ILK de diversas dianas que promueven proliferación, supervivencia y migración celular, como es el caso de Rictor, un conocido regulador del dinamismo del citoesqueleto que interactúa con ILK para promover la fosforilación de Akt, permitiendo la supervivencia celular de células cancerígenas (Sarbasov et al., 2004)

La adquisición de características invasivas y migratorias en células cancerígenas resulta principalmente de la adopción de un fenotipo de tipo transición epitelio-mesénquima (EMT). ILK actúa promoviendo la adquisición de este fenotipo y la invasión celular a través de un incremento en la expresión de varias proteasas que degradan la matriz extracelular (Cortez et al., 2011). ILK juega un papel predominante en la EMT inducida por endotelina-1 (ET-1) y en el desarrollo del fenotipo invasivo en cáncer de ovarios por incremento de los niveles de Snail, estabilizando los niveles de β -catenina y suprimiendo la expresión de E-caderina a través de la vía de señalización dependiente de PI3K.

La inhibición de la sobreexpresión de ILK y la vuelta a su expresión y/o actividad a niveles normales podría por tanto constituir una diana terapéutica beneficiosa en los pacientes de cáncer. La reducción de la expresión de ILK en células cancerígenas puede ser realizada por terapia génica mediante el uso de ARN de interferencia u oligonucleótidos antisentido, o por el uso de inhibidores farmacológicos (McDonald et al., 2008).

4.4.2 PAPEL DE ILK EN LA HIPERTROFIA CARDIACA.

ILK es muy abundante en el corazón, donde se encuentra transduciendo señales de estrés bioquímico dependiente de integrina β_1 en células contráctiles (Hannigan et al., 1996). ILK se encuentra localizada en los costámeros, complejos de unión que unen la matriz extracelular (colágeno IV, laminina) con la actina y miosina presente en los sarcómeros (Brancaccio et al., 2006).

La hipertrofia cardiaca se considera una respuesta compensatoria y adaptativa a la sobrecarga de presión o volumen, con el objetivo de preservar la función cardiaca. La hipertrofia patológica se refiere a efectos perjudiciales sobre la estructura y la función cardiaca causados por distintos factores de estrés como son la hipertensión, el exceso de carga mecánica causada por lesiones estructurales, y mutaciones en genes contráctiles de miocitos (Seidman y Seidman, 2001). Trabajos realizados en la última década han identificado cómo vías de transducción de señales a través de protein-quinasas son capaces de estimular hipertrofia cardiaca (Dorn y Force, 2005).

La sobreexpresión de ILK en ratones transgénicos induce hipertrofia cardiomiocítica (Lu et al., 2006). Bioquímicamente, la hipertrofia inducida por ILK se caracteriza por la activación de un número de proteínas-quinasas citoplásmicas prohipertróficas como son Akt, GSK-3 β , proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38^{MAPK}; del inglés, p38 mitogen-activated protein kinase), quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs; del inglés, extracellular signal-regulated kinases) y mTOR; todas implicadas en el crecimiento de células cardíacas (Hannigan et al., 2005) (Figura 20).

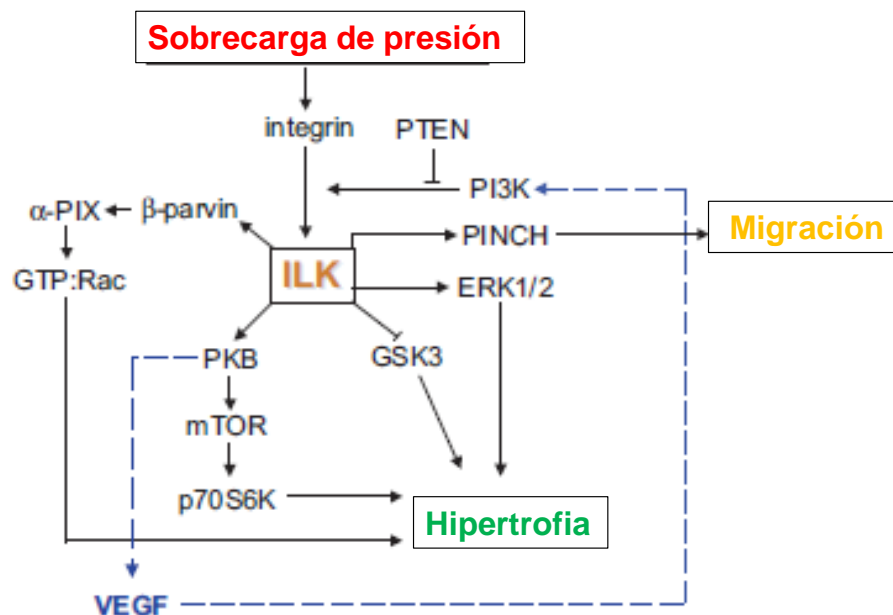


Figura 20. Papel central de ILK en la transducción de señales en la hipertrofia cardíaca.

ILK presenta un papel regulador en la señalización de moléculas que median la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión *in vivo*. La línea azul discontinua muestra el potencial de un “loop” entre ILK y VEGF promoviendo la hipertrofia. El papel de PINCH en la regulación de la hipertrofia *in vivo* aún no ha sido investigado, pero sí se ha observado que muestra un papel en la migración de los cardiomiocitos, el cual tiene un papel importante durante la reparación cardíaca post-infarto. Fuente: Hannigan et al., 2007.

Se han observado niveles de ILK aumentados en casos de hipertrofia humana causados por obstrucción del tracto de salida tanto congénita como adquirida (Lu et al., 2006). Se ha descrito que la terapia génica con ILK puede atenuar el remodelado ventricular y mejorar la función cardíaca en modelos de rata de infarto de miocardio mediado por un incremento en la angiogénesis, proliferación de cardiomiocitos y reducción de la apoptosis (Ding et al., 2009).

4.4.3 ILK Y PATOLOGÍA RENAL.

ILK se ha convertido en un jugador clave en la interfaz entre la matriz extracelular, las integrinas, el citoesqueleto de actina y el fenotipo celular en el riñón enfermo (Blattner et al., 2005). Recientes estudios han relacionado la desregulación de ILK con el desarrollo de distintas enfermedades crónicas renales como son el síndrome nefrítico congénito, la nefropatía diabética y la fibrosis renal (Guo et al., 2001; Kretzler et al., 2001; Li et al., 2003).

La nefropatía diabética es una de las principales complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus y es la principal causa de enfermedad renal en estadio final. Entre los tipos celulares implicados en el daño renal se encuentran los podocitos y las células mesangiales. En el riñón con nefropatía diabética observamos hiperfiltración, microalbuminuria e hipeplasia/hipertrofia de diversos tipos celulares del glomérulo y los túbulos (Wolf, 2000; Wada et al., 2008). La hipertrofia de la célula mesangial, el engrosamiento de la membrana basal y la expansión de la matriz extracelular del mesangio son características patológicas de la nefropatía diabética. Se ha visto que los niveles de ILK se encuentran aumentados en el mesangio glomerular de muestras humanas de riñones con nefropatía diabética, sugiriendo la posible participación de ILK en la expansión de la matriz mesangial (Guo et al., 2001). Sin embargo poco se sabe sobre el papel de ILK en células mesangiales o la importancia de la ILK sobre la regulación en respuesta a los altos niveles de glucosa. En un estudio *in vitro* se ha observado que el aumento en la expresión de ILK en células mesangiales en presencia de elevados niveles de glucosa se debe a su acción hiperósmótica. ILK podría estar participando en la protección de las células mesangiales de la tensión osmótica asociada a la hiperglucemia a través de la activación de la vía de señalización de supervivencia PKB/Akt (Ohnishi et al., 2006).

Por otro lado se ha visto que el daño en los podocitos juega un papel clave en el desarrollo de la nefropatía diabética (Wolf et al., 2005; Shankland et al., 2006). Recientes estudios han mostrado que ILK presenta un papel importante en la biología del podocito. El ratón knock-out condicional para ILK en podocitos muestra proteinuria masiva, glomeruloesclerosis y muerte prematura (Dai et al., 2006; El-Aouni et al., 2006). ILK interacciona con integrinas, las cuales están

involucradas en la transducción de señales “hacia fuera” y “hacia dentro” de la célula, que son esenciales para el mantenimiento de la función normal de la membrana basal glomerular y el podocito (Teixeira Vde et al., 2005). Se ha observado que el aumento de expresión de ILK en ratas con nefropatía diabética correlaciona con el daño en podocitos, así como con la albuminuria (Dai et al., 2012).

La fibrosis intersticial renal se considera un resultado común de una amplia variedad de enfermedades crónicas renales con diversas causas (Eddy, 2000). ILK presenta una función muy importante en la mediación de la transición epitelio-mesénquima (EMT) tubular y la patogénesis de la fibrosis renal. La nefropatía obstructiva es un modelo agresivo de fibrosis intersticial renal caracterizada por EMT tubular, activación de miofibroblastos y deposición de matriz (Yang y Liu, 2001; Yang y Liu, 2002). En estudios previos se ha visto que ILK se expresa de forma predominante y específica en el epitelio tubular renal tras daño obstructivo en modelos de ratón de obstrucción unilateral ureteral (UUO; del inglés, *unilateral ureteral obstruction*) (Li et al., 2003). La administración *in vivo* de un inhibidor de ILK, QLT-0267, atenúa la producción de matriz y reduce la fibrosis renal en la nefropatía obstructiva (Li et al., 2009).

4.4.4 ILK Y ENVEJECIMIENTO.

Hasta este momento apenas existen referencias en la bibliografía que relacionen ILK y el proceso de envejecimiento. El papel de ILK dentro del proceso de envejecimiento comenzó a tener más relevancia a partir de un estudio realizado en ratas, donde se observó que los niveles de ILK se encontraban aumentados en ratas viejas (Gu et al., 2005). Actualmente no existen datos claros sobre si el aumento en los niveles de ILK es una consecuencia del proceso de envejecimiento o por el contrario si es el aumento de esta vía de señalización el que induce el proceso de envejecimiento. A favor de esta segunda idea se ha observado que la sobreexpresión de ILK induce senescencia celular en cardiomiocitos.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general de este estudio es analizar el papel de la hiperfosfatemia en el proceso de senescencia celular y el envejecimiento a nivel de los sistemas renales y vasculares, explorando los mecanismos involucrados, con especial atención en la implicación de ILK en el proceso.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.1 Estudiar *in vivo* los mecanismos implicados en el aumento de los niveles de fosfato en suero durante el envejecimiento y analizar si existe alguna relación con el proceso de senescencia celular y los niveles de ILK. Para ello se realizaron los siguientes estudios:

- Análisis de genes implicados en la homeostásis del calcio y el fósforo regulados por el eje Klotho/FGF23 a nivel de la corteza renal.
- Análisis de las vías de senescencia celular en corteza renal.
- Análisis de los niveles de ILK en corteza renal y su relación con la proteína anti-envejecimiento Klotho.

2.2 Estudiar *in vitro* los mecanismos intracelulares implicados en el proceso de senescencia celular inducida por altos niveles de fosfato a nivel vascular, centrándonos en el papel de ILK. Para ello se analizaron:

- Vías de senescencia implicadas.
- Implicación de ILK en el proceso de senescencia celular.
- Implicación de la vía de PI3K-Akt-FoxO y su relación con ILK.
- Papel del estrés oxidativo en la senescencia celular inducida por altas concentraciones de fosfato.

2.3 Analizar *in vitro* la implicación de ILK en la senescencia celular inducida por otros estímulos.

- Vías implicadas en el proceso de senescencia celular inducida por albumina glicosilada y glucosa oxidasa en células mesangiales humanas y células tubulares proximales de ratón.
- Implicación de ILK en el proceso de senescencia celular inducida por albumina glicosilada y glucosa oxidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para llevar a cabo este trabajo, se realizaron tanto experimentos *in vivo* como *in vitro*. Los experimentos *in vivo* se realizaron en ratones macho *wild type* C57BL6 y muestras de aorta de ratas Wistar. Para los experimentos *in vitro* se utilizaron distintas estirpes celulares: células mesangiales humanas (CMH), células tubulares de ratón (CTM) y células musculares lisas de aorta humana (CML).

1.1 ESTUDIOS *IN VIVO*.

En los estudios *in vivo* se utilizaron ratones machos *wild type* C57BL6 divididos en dos grupos: 15 meses (ratones que muestran primeros signos de envejecimiento) y 3 meses (jóvenes). En estos animales se analizaron los niveles de fosfato en plasma y los niveles de expresión de Klotho, del transportador de fosfato NaPi2a, de la enzima 1 α -hidroxilasa, de la enzima 24-hidroxilasa, de ILK, de p53 y p16^{INK4a} a nivel de corteza renal. Por otro lado se utilizaron de aorta de ratas Wistar sometidas a nefrectomía 5/6 y divididas en dos grupos: ratas control y ratas sometidas a una dieta rica en fosfato. En estas muestras se analizaron los niveles de ILK, p53 y p16^{INK4a}.

1.2 ESTUDIOS *IN VITRO*.

Para analizar los efectos de las altas concentraciones de fosfato sobre el proceso de senescencia celular a nivel vascular se incubaron células CML de aorta humana con beta-glicerofosfato (BGP: fuente exógena de fosfato) a una concentración de 10mM de 24 a 72 horas. En primer lugar se estudió la senescencia celular a través del análisis de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia, así como las vías implicadas: p21, p53 y p16^{INK4a}. La especificidad del tratamiento se testó mediante el uso de un inhibidor del transportador de fosfato (Pit-1), el ácido fosfonofórmico (PFA), a una concentración de 0.5mM.

Para estudiar la implicación de ILK en el proceso de senescencia inducida por las altas concentraciones de fosfato se analizaron los niveles de ILK así como de su actividad quinasa, determinada de forma indirecta por medición de la

fosforilación de su substrato GSK-3 β , en células CML tratadas con BGP. Posteriormente se analizó el efecto del silenciamiento de ILK con un ARN de interferencia sobre las vías de senescencia analizando la expresión de p53 y p16^{INK4a} y la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.

En estas células se analizó la vía PI3K-Akt-FoxO como posible mecanismo intracelular implicado en el mecanismo de senescencia inducido por BGP. La actividad de Akt y FoxO se determinó mediante análisis de sus formas fosforiladas (pAkt y pFoxO). La activación de PI3K se estudió mediante el análisis de la expresión de p53 y p16^{INK4a} en células tratadas con un inhibidor farmacológico para PI3K, LY294002 (30 μ M). Para analizar la implicación de ILK en la vía se observó el efecto del silenciamiento de ILK sobre la fosforilación de Akt.

En este mismo sistema se estudió la implicación de la producción de oxidantes midiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la producción de anión superóxido (O₂⁻) y la depleción de GSH. Para analizar la implicación de ILK en la producción de los distintos oxidantes se analizó el efecto del silenciamiento de ILK sobre la producción de los mismos. Para determinar si el efecto sobre la senescencia era debido al aumento en la producción de oxidantes se analizó la expresión de p53 y p16^{INK4a} en CML tratadas con el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) y con catalasa exógena.

Por último, para estudiar *in vitro* el papel de ILK en el proceso de senescencia celular a nivel renal se incubaron CMH y CTM con albumina glicosilada (AG) (100 μ g/ml) durante periodos de tiempo de 24 a 72 horas. Se analizó la vía de senescencia de p53 y los niveles de ILK así como su actividad. Para analizar la implicación de ILK en este proceso se silenció su expresión mediante el uso de un ARN de interferencia específico y se analizaron los niveles de p53.

Para corroborar el resultado anterior, se utilizó otro estímulo senescente, la glucosa oxidasa (GOx). CTM fueron incubadas con GOx (2mU/ml) hasta 72 horas. Se analizó la vía de senescencia de p53 y los niveles de ILK así como su actividad.

2. ESTUDIOS *IN VIVO*.

2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los experimentos *in vivo* se realizaron en ratones *wild type* C57BL6, que fueron divididos en dos grupos experimentales, un grupo de animales de 3 meses de edad (jóvenes) y otro grupo con una edad de 15 meses (viejos).

Se utilizaron 10 animales por grupo. Todos los ratones utilizados fueron machos, mantenidos en unas condiciones estándar de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclos de 12h de luz y 54 % de humedad relativa. Se les proporcionó agua y comida *ab libitum*.

Para determinar la acción del fosfato se utilizaron muestras de aorta de ratas *Wistar* adultas sometidas a nefrectomía 5/6 divididos en dos grupos experimentales, uno mantenido con una dieta normal y otro mantenido con una dieta alta en fosfato durante 16 semanas. Estas muestras fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Jorge Cannata (Instituto de Investigación Reina Sofía de Investigación, Oviedo).

2.1.1 RECOGIDA DE MUESTRAS.

El día previo al sacrificio los animales se mantuvieron de forma individual en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24h. La orina se centrifugó a 1.500rpm durante 10 minutos a 4°C , y se almacenó a -20°C . Posteriormente los animales se anestesiaron con isofluorano y se llevo a cabo la extracción de sangre directamente del corazón. A continuación se recogieron muestras de corteza renal, médula renal y de aorta, que se mantuvieron en RNA *later* (Ambion; Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) a 4°C durante 24h y posteriormente se almacenaron a -80°C . Para su posterior análisis la sangre extraída se centrifugó a 3.000rpm durante 15 minutos para recoger el plasma donde se midieron los niveles de fosfato.

2.2 TÉCNICAS EMPLEADAS.

2.2.1 MEDIDA DE LOS NIVELES DE FOSFATO EN PLASMA.

Para llevar a cabo la cuantificación de los niveles de fosfato en plasma se realizó un ensayo colorimétrico mediante el uso de un Kit comercial (BioVision Inc, Milpitas, CA, EEUU). El kit presenta un sustrato que contiene verde malaquita y molibdato amónico que forma un complejo cromogénico con el ion fosfato. Las soluciones de la curva estándar y las muestras se pusieron en una placa de 96 pocillos. A continuación se añadió el sustrato y se dejó incubar la reacción durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650nm. Los valores obtenidos se interpolaron en la curva patrón dando lugar a valores de fosfato en mM.

2.2.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA. RT-PCR CUANTITATIVA.

El análisis de la expresión del ARNm se realizó mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR; del inglés, *Reverse transcription quantitative PCR*). El fluoróforo utilizado fue SYBR Green (Applied Biosystem Inc. Foster City, CA, EEUU), con un pico de absorción a una longitud de onda de $\lambda = 498\text{nm}$ y un pico de emisión a una longitud de onda de $\lambda = 522\text{nm}$. El molde empleado fue ADN complementario (ADNc) de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de ARN.

La extracción del ARN se realizó a partir de una pequeña cantidad de tejido mediante el método desnaturalizante del tiocianato de guanidino y la extracción con fenol/cloroformo (Chomczynski, 1993). Al tejido se le añadió 1ml de Trizol (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) y se homogenizó hasta la disgregación, obteniéndose una solución viscosa. La mezcla se incubó durante 3 minutos para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas y posteriormente se le añadió 200 μl de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar 5 minutos. A continuación se centrifugaron las muestras a 13.000rpm durante 15 minutos a 4°C obteniéndose tres fases: una fase orgánica (inferior), una interfase blanquecina lipídica y una fase acuosa incolora (superior) donde se encuentra disuelto el ARN. Se recogió la fase acuosa y se añadieron 500 μl de isopropanol para precipitar el ARN, se centrifugó a 13.000rpm durante 10 minutos. El ARN precipitado se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en agua libre

de enzimas capaces de degradar el ARN (ARNasas). La concentración total de ARN se determinó en un espectrofotómetro VIS-UV (Nanodrop).

A partir del ARN extraído se sintetizó el ADN copia (ADNc) utilizando el High Capacity™ (Applied Biosystem Inc. Foster City, CA, EEUU). La expresión de los distintos genes se midió por RT-qPCR (ABI Prism 7500) mediante ensayo SyBR Green y método doble delta Ct. Los primers utilizados para los distintos genes se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2).

Primers	Secuencia
<i>ILK (Mm)</i>	Forward: 5'- GGG CTC TTG TGA GCT TCT GT Reverse: 3'- GAG TGG TCC CCT TCC AGA AT
<i>Klotho (Mm)</i>	Forward: 5'- AAT TAT GTG AAT GAG GCT CTG AAA G Reverse: 3'- TAC GCA AAG TAG CCA CAA AGG
<i>NaPi2a (Mm)</i>	Forward: 5'- GCC ACT TCT TCT TCA ACA TC Reverse: 3'- CAC ACG AGG AGG TAG AGG
<i>1α-hidroxilasa (Mm)</i>	Forward: 5'- CCG CGG GCT ATG CTG GAA C Reverse: 3'- CTC TGG GCA AAG GCA AAC ATC T
<i>24-hidroxilasa (Mm)</i>	Forward: 5'- TGG GAA GAT GAT GGT GAC CC Reverse: 3'- ACT GTT CCT TTG GGT AGC GT
<i>GAPDH (Mm)</i>	Forward: 5'- CCA CCC AGA AGA CTG TGG AT Reverse: 3'- CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en RT-qPCR en el modelo *in vivo*

2.2.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO PROTEÍCO EN TEJIDO MEDIANTE WESTERN-BLOT.

Porciones de corteza renal se incubaron en un tampón de lisis (Tris-HCl 10mM, pH 7,6, 1% Tritón X-100, EDTA 1mM, 0,1 % deoxicolato sódico, NaVO₄ 500mM, NaF 50mM, PMSF 1mM, pepstatina/leupeptina/aprotinina 1mM) durante 20 minutos en hielo. A continuación las muestras se centrifugaron a 13.000rpm durante 15 minutos a 4°C, desechándose los precipitados. La concentración de

proteínas del sobrenadante se cuantificó utilizando el kit Dc Protein Assay (Bio-rad, Hercules, CA, EEUU). A las muestras se les añadió SDS 5x y se calentaron a 95°C durante 5 minutos para conseguir la desnaturalización de las proteínas.

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida (National Diagnostics, Atlanta, GA, EEUU), de distinto porcentaje según el peso molecular de la proteína de interés, según la técnica de western blot (Towbin et al., 1992). Después las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Perkin Elmer, Boston, MA, EEUU) por transferencia semi-seca. Las membranas se bloquearon para evitar uniones inespecíficas en tampón-tris salino (TBS) con 0.1% de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) con 5% de leche (leche en polvo desnatada, Central Lechera Asturiana) o al 5% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) en el caso de los anticuerpos fosforilados, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con su correspondiente anticuerpo primario (Tabla 3) en BSA al 3%. A la mañana siguiente, tras lavar con TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 3). Por último las membranas se lavaron de nuevo con TTBS y se revelaron utilizando ECL Western blotting detection reagents (Thermo Scientific, Rockford. IL, EEUU) y la exposición a películas X-OMAT (Kodak, Rochester, NY, EEUU).

Anticuerpo Primario	Casa Comercial (Referencia)	Anticuerpo Secundario
<i>p53 (1:1000)</i>	Sigma-Aldrich (SAB4503001)	<i>Mouse (1:2000) (DAKO p0260)</i>
<i>p16 (1:1000)</i>	Abcam (3562-1)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>ILK (1:1000)</i>	Cell Signaling (3862S)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>GAPDH (1:1000)</i>	Sigma-Aldrich (G8795)	<i>Mouse (1:2000) (DAKO p0260)</i>

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para western blot en el estudio *in vivo*

3 ESTUDIOS *IN VITRO*.

3.1 CULTIVOS CELULARES.

3.1.1 CULTIVO DE CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS.

Las células mesangiales humanas (CMH) se cultivaron según el procedimiento descrito previamente (Diez-Marques et al., 1995). Se utilizaron porciones de corteza renal sana de riñones humanos tras nefrectomía por carcinoma renal. Los glomérulos se aislaron mediante tamizado y se trataron con colagenasa para la obtención de las células mesangiales. Las CMH se mantuvieron en placas petri de plástico en medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, M.D., EEUU), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*), penicilina (0.66µg/ml) y estreptomicina sulfato (60µg/ml) (Gibco, Paisley, Reino Unido) en una atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C de temperatura.

3.1.2 CULTIVO DE CÉLULAS TUBULARES DE RATÓN.

Las células tubulares de ratón (CTM) son una línea celular murina de células epiteliales tubulares proximales originalmente obtenidas por Eric Neilson (Vanderbilt University, Nashville, TN) y que han sido ampliamente caracterizadas (Haverty et al., 1988). Las células CTM se mantuvieron en placas petri con medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina (0.66µg/ml) y estreptomicina sulfato (60µg/ml) en atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C de temperatura. Las células CTM fueron amablemente cedidas por la Dra. Ruiz de la Fundación Jiménez Díaz.

3.1.3 CULTIVO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA HUMANA.

Las células de músculo liso de aorta humana (CML) se obtuvieron por disociación enzimática a partir de las aortas de 5 donantes de órganos de acuerdo a las disposiciones legales españolas y el comité ético del Hospital Universitario de Getafe, según se describe previamente (Peiro et al., 2001). En

nuestro laboratorio las células se mantuvieron en placas petri de plástico con medio DMEM (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) suplementado con 10% de suero de ternera (BS, *bovine serum*), L-glutamina (1mM), penicilina (0.66µg/ml), estreptomicina sulfato (60µg/ml) (Gibco, Paisley, Reino Unido) y anfotericina B (250 µg/ml) (Lonza, Walkersville, M.D., EEUU,) en atmósfera al 5% de CO₂ y a 37°C de temperatura. Las células CML fueron amablemente cedidas por el Dr. Sánchez Ferrer de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.2 REACTIVOS Y CONDICIONES DE UTILIZACIÓN.

Los tratamientos celulares se llevaron a cabo tras deprivación de 24 horas en medio sin suero para que las células alcanzaran la quiescencia celular.

3.2.1 ESTIMULANTES DE LA RESPUESTA CELULAR.

- Beta-glicerofosfato (BGP; Calbiochem, Gibbstown, NJ, EEUU): es un donador de grupos fosfatos utilizado en estudios de mineralización de matriz, actuando como inhibidor de la proteína fosfatasa. Acelera la calcificación vascular en células vasculares de músculo liso. El compuesto se utilizó a una concentración final de 10mM y se incubó a distintos tiempos. La solución se preparó con agua estéril bajo condiciones de esterilidad.
- Albumina Glicosilada (AG; Sigma, St. Louis, MO, EEUU): producto de glicosilación avanzado, utilizado como estímulo senescente. Se utilizó a una dosis de 100µg/ml a los siguientes tiempos: 24, 48 y 72 horas. El stock de uso se preparó con agua estéril y bajo condiciones de esterilidad.
- Glucosa Oxidasa (GOx; Sigma, St. Louis, MO, EEUU): enzima que en un medio con glucosa es capaz de producir peróxido de hidrógeno generando una situación de estrés oxidativo. Se utilizó a una dosis de 2mU/ml y se incubó a 24, 48 y 72 horas. Las diluciones se prepararon con agua estéril en el momento de uso y bajo condiciones de esterilidad.
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂; Sigma, St. Louis, MO, EEUU): las células se incubaron durante 1 hora con una concentración de 1mM de H₂O₂. La

solución de trabajo se preparó en el momento de uso, con agua estéril y bajo condiciones de esterilidad.

3.2.2 INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS.

- Ácido Fosfonofórmico (PFA; Sigma, St. Louis, MO, EEUU): inhibidor del transportador de fosfato Pit-1, bloquea la entrada del fosfato presente en el medio al interior de la célula. Las células se preincubaron 15 minutos antes del tratamiento con el PFA a una concentración de 0,5mM.
- LY294002 (LY, Cell Signaling technology, Danvers, MA, EEUU): inhibidor selectivo de la actividad fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K). Utilizado a una concentración de 30μM. Las células se preincubaron 15 minutos antes del tratamiento con el BGP.
- N-acetil-cisteína (NAC; Sigma, St. Louis, MO, EEUU): es un compuesto antioxidante y agente mucolítico que aumenta el pool de degradadores de radicales libres. El tratamiento con NAC se realizó 15 minutos antes del tratamiento con el estímulo a una concentración final de 10mM.
- Catalasa (CAT; Sigma, St. Louis, MO, EEUU): enzima encargada de transformar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Las células se preincubaron con CAT, a una concentración de 160U/ml, 15 minutos antes del tratamiento con el BGP.

3.3 TÉCNICAS EMPLEADAS.

3.3.1 ANÁLISIS DEL CONTENIDO PROTEÍCO CELULAR MEDIANTE WESTERN BOLT.

Una vez finalizados los distintos tratamientos las células se dejaron a 4°C donde se lavaron con PBS 1X frío dos veces y a continuación se solubilizaron en un tampón de lisis (Tris-HCl 20mM pH7.4, EDTA 1mM, 10% v/v glicerol, KCl 100mM, 1% Tritón X-100, 0.5% v/v β-mercaptoetanol, NaF 5mM, NaVO₄ 0.2mM, MgCl₂ 5mM, PMSF 1mM, pepstatina/leupeptina/aprotinina 1mM). La solución resultante se centrifugó a 13.000rpm durante 5 minutos a 4°C. La concentración de proteínas del sobrenadante se cuantificó utilizando el kit Dc Protein Assay

(Bio-rad, Hercules, CA, EEUU). A las muestras se les añadió SDS 5x y fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos para conseguir la desnaturalización de las proteínas.

El análisis por western blot se realizó como describimos previamente en el apartado 1.2.3. Los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes utilizados así como las concentraciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4).

Anticuerpo Primario	Casa Comercial (Referencia)	Anticuerpo Secundario
<i>p53 (1:1000)</i>	Sigma-Aldrich (SAB4503001)	<i>Mouse (1:2000) (DAKO p0260)</i>
<i>p16 (1:1000)</i>	Abcam (3562-1)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>ILK (1:1000)</i>	Cell Signaling (3862S)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>GAPDH (1:1000)</i>	Sigma-Aldrich (G8795)	<i>Mouse (1:2000) (DAKO p0260)</i>
<i>pGSK-3β (Ser9) (1:1000)</i>	Cell Signaling (9336)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>GSK-3β (1:1000)</i>	Cell Signaling (9315)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>p21 (1:500)</i>	BD biosciences (556430)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>pAkt (Ser 473) (1:1000)</i>	Cell Signaling (9271)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>Akt (1:1000)</i>	Cell Signaling (9272)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>pFoxO (1:1000)</i>	Cell Signaling (9461)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>
<i>FoxO (1:1000)</i>	Cell Signaling (2880)	<i>Rabbit (1:5000) (Chemicon AP132P)</i>

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para western blot en el estudio *in vitro*

3.3.2 SILENCIAMIENTO DE ILK Y KLOTHO MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.

Para llevar a cabo el silenciamiento de ILK las células se transfectaron con un ARN específico para ILK y un ARN inespecífico como control negativo mediante el uso de lipofectamina 2000 (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido). Las células previamente sembradas en una placa de 6 pocillos, en condiciones de subconfluencia, se incubaron con una mezcla de 3 oligonucleótidos específicos (ILK1, ILK2 e ILK3) a 20nM cada uno (Bionova, Gen Link™, *pre-*

designed siRNA, standar purity, annealed 27-6430-05) o con un control negativo a 50nM (Silencer™ *negative control#1 siRNA*; Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) y 3µl de lipofectamina en 1 ml de OPTI-MEN®, durante 24 horas. A continuación se retiró la mezcla de transfección y se añadieron 2ml de medio con suero al 10%. Las células se dejaron recuperar durante 72h. Tras el tiempo de recuperación las células se privaron y se trataron con el estímulo correspondiente.

3.3.3 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.

Para poder determinar la actividad β -galactosidasa se utilizó como sustrato la β -galactosidasa 5-dodecanoilaminofluoresceína di- β -Galactopiranósido (C₁₂FDG; Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) (Plovins et al., 1994).

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares de cristal estériles (Microscope Cover Glass 12mm; Thermo Scientific, Chicago, IL, EEUU). Tras el tratamiento correspondiente, las células se incubaron con C₁₂FDG a una concentración de 33µM durante 4 horas. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 15 minutos. A continuación las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS 1X y montadas con líquido de montaje ProLong®Gold antifade Reagent (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) que contiene DAPI para la tinción de los núcleos. Las muestras se observaron en un microscopio confocal LEICA TCS-SP5 (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) utilizando un láser de excitación a 488nm que detecta la sonda fluorescente y un diodo de 405nm que detecta el DAPI. Las imágenes capturadas se analizaron mediante el uso del programa ImageJ (<http://rsbweb.nhi.gov/ij/>) donde medimos la intensidad de fluorescencia por densitometría. Los resultados se mostraron en forma de tanto por ciento frente al control.

3.3.4 MEDIDA DE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ANIÓN SUPERÓXIDO POR MICROSCOPIA CONFOCAL.

Para determinar los niveles de ROS intracelulares se utilizó la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA; Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Esta sonda es permeable a la célula, en su interior es oxidada dando lugar a un producto fluorescente DCF (Kristiansen et al., 2009). Para determinar los niveles de anión superóxido utilizamos otra sonda fluorescente que es el dihidroetidio (DHE; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) permeable a la célula y utilizado como indicador redox. Presenta fluorescencia azul hasta que es oxidado a etidio que muestra fluorescencia en rojo (Bindokas et al., 1996). En ambos casos las células se sembraron en placas estériles no tratadas de 35mm específicas para confocal (Ibidi; Martinsried, Alemania), las cuales se trataron previamente con gelatina al 0.2% (Conda; National Diagnostics, Atlanta, GA, EEUU) para favorecer la adhesión de la célula a la placa. Al día siguiente las células se privaron y se trataron con el tratamiento correspondiente. El último día de tratamiento se retiró el medio y se añadió medio nuevo libre de suero con la sonda correspondiente. En el caso de la DCFH-DA la sonda se incubó a una concentración de 5µM durante 30 minutos a 37°C en oscuridad, en el caso del DHE la sonda se incubó a una concentración de 1.5µM durante 10 minutos a 37°C en oscuridad. Tras la incubación con las sondas las células se lavaron dos veces con PBS 1X y directamente se observaron en microscopio confocal. Las imágenes capturadas se analizaron mediante el uso del programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) donde se midió la intensidad de fluorescencia por densitometría. Los resultados se mostraron en forma de tanto por ciento frente al control.

3.3.5 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GSH REDUCIDOS.

Los niveles de glutatión reducido (GSH) se determinaron usando la sonda monoclorobimano (MCLB; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) permeable a la célula y que forma un aducto con GSH que produce fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 380nm (Kamencic et al., 2000). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se trataron con BGP a distintos tiempos. Una vez finalizados los tratamientos el MCLB se añadió al medio a una concentración de 100µM y se incubó durante una hora a 37°C en oscuridad. Tras la hora de

incubación la placa se analizó en un fluorímetro Fluoroscan (Perkin Elmer Oy, Turku, Finlandia) (20ms de tiempo de integración a una λ = 390nm de excitación y una λ = 485nm de emisión). El basal de autofluorescencia se determinó en células no incubadas con la sonda y se restó al valor de todas las muestras. La medida de fluorescencia de células no tratadas se consideró como el 100% de los niveles de GSH. Como control positivo las células se trataron con H_2O_2 durante 1 hora a 1mM. Los resultados se mostraron en tanto por ciento con respecto del control.

4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se mostraron como tanto por ciento con respecto del control y constituyen la media \pm error estándar de una n de tres experimentos (ver pies de figura). Los valores densitométricos de los western-blot se corrigieron por la variación de carga de las correspondientes bandas de GAPDH.

Para los análisis paramétricos de dos grupos de resultados se utilizó el test de t de Student para datos pareados y no pareados según el caso. Para el análisis de múltiples grupos se utilizó el ANOVA de una o doble vía, seguido de una comparación múltiple de medias. Para los análisis no paramétricos de dos grupos se utilizó la U de Mann-Whitney, mientras que para el análisis de múltiples grupos se utilizaron Friedman o Kruskal Wallis, para datos pareados o no pareados respectivamente. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa en todos los casos. Los análisis estadísticos se realizaron con el Software GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

1. ESTUDIO *IN VIVO* DE LA RELACIÓN ENTRE LA HIPERFOSFATEMIA, EL PROCESO DE SENESCENCIA Y LOS NIVELES DE ILK EN EL ENVEJECIMIENTO.

1.1 LOS RATONES DE 15 MESES PRESENTAN ELEVADOS NIVELES DE FOSFATO SÉRICO, DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA ANTI-ENVEJECIMIENTO KLOTHO Y CAMBIOS EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO Ca-Pi EN CORTEZA RENAL.

En primer lugar se analizaron los niveles de fosfato en suero de ratones macho C57BL6 de 15 meses comparándolos con ratones de 3 meses. En los ratones de 15 meses se observó un aumento significativo de los niveles de fosfato con respecto a los ratones de 3 meses (Figura 1).

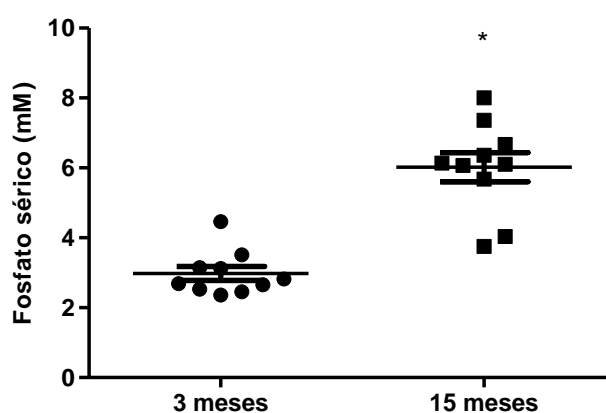


Figura 1. Los niveles de fosfato se encuentran elevados en ratones de 15 meses. Determinación de los niveles de fosfato sérico en ratones de 3 meses (n=10) y ratones de 15 meses (n=10). *p<0.05 vs 3 meses.

Para conocer los mecanismos que podrían estar implicados en el aumento de los niveles de fosfato en los ratones de 15 meses se analizaron los niveles de la proteína Klotho en corteza renal mediante RT-qPCR. Klotho se encuentra formando parte de un sistema de regulación endocrino de los niveles plasmáticos de fosfato junto con la vitamina D y PTH (Kuro-o, 2011). Los

resultados muestran que los niveles de Klotho en ratones viejos se encuentran disminuidos con respecto a los jóvenes (Figura 2A).

En el riñón la activación de la vía Klotho/FGF23 regula la expresión del cotransportador NaPi2a presente en la membrana apical de la célula tubular, disminuyendo su expresión y en consecuencia disminuyendo la reabsorción de fosfato y aumentando la excreción renal del mismo (Cheng et al., 2011). En los animales de 15 meses la disminución de los niveles de Klotho se acompañó de un aumento en la expresión de los niveles del transportador de fosfato, determinado por RT-qPCR en corteza renal (Figura 2B).

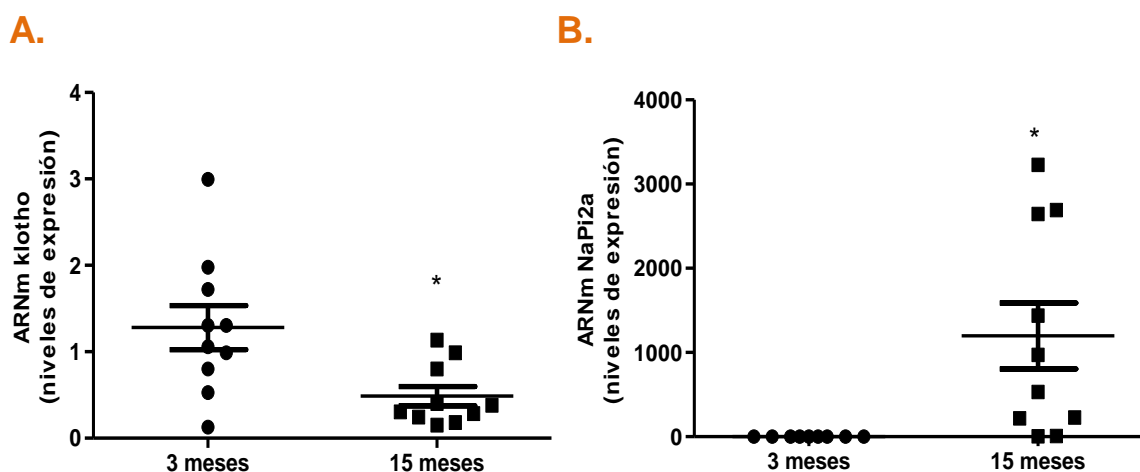


Figura 2. Los ratones de 15 meses presentan bajos niveles de Klotho y altos niveles del transportador de fosfato NaPi2a con respecto a ratones de 3 meses. (A) Análisis de los niveles de ARNm de Klotho en animales de 3 meses (n=10) y 15 meses (n=10). * $p < 0.05$ vs 3 meses. **(B)** Análisis de los niveles de ARNm del transportador de fosfato NaPi2a en animales de 3 meses (n=10) y 15 meses (n=10). * $p < 0.05$ vs 3 meses.

La activación de la vía Klotho/FGF23 disminuye la expresión de la enzima 1 α -hidroxilasa (Cyp27b1) en el riñón, que genera la forma activa de la vitamina D y aumenta la expresión de la enzima 24-hidroxilasa (Cyp24) que inactiva la vitamina D (Cheng et al., 2011).

Por este motivo se pasó a estudiar mediante RT-qPCR la expresión de los genes 1 α -hidroxilasa y 24-hidroxilasa. Se observó que los niveles de la enzima 1 α -hidroxilasa se encontraban aumentados de forma significativa en los ratones

de 15 meses (Figura 3A), mientras que los niveles de la enzima 24-hidroxisalasa presentan una disminución estadísticamente significativa (Figura 3B).

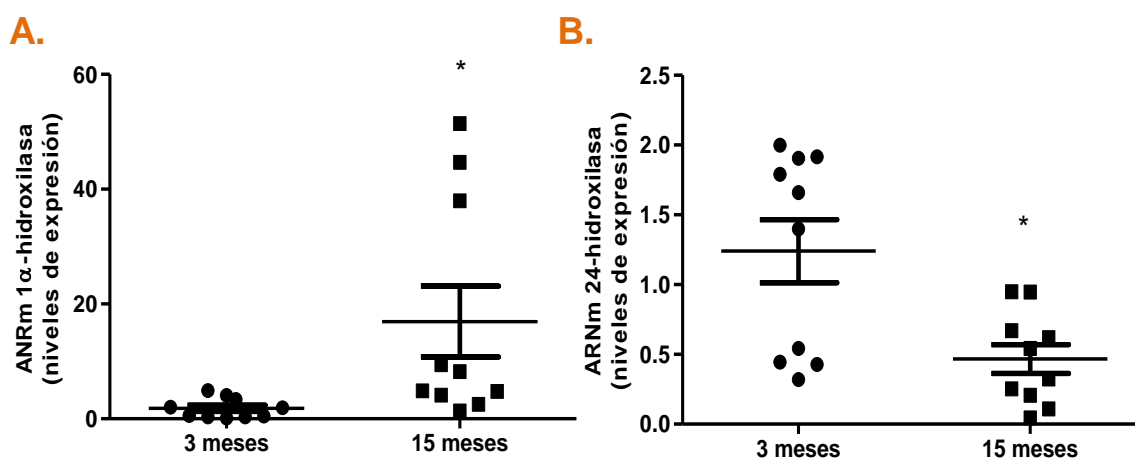


Figura 3. Los ratones de 15 meses presentan un aumento en la expresión de 1α-hidroxisalasa y una disminución en la expresión de 24-hidroxisalasa. (A) Análisis de los niveles de ARNm de la enzima 1α-hidroxisalasa (Cyp27b1) en animales de 3 meses (n=10) y 15 meses (n=10). **(B)** Análisis de los niveles de ARNm de la enzima 24-hidroxisalasa (Cyp24) en animales de 3 meses (n=10) y 15 meses (n=10). *p<0.05 vs 3 meses.

Estos resultados indicarían que la hiperfosfatemia encontrada en los ratones de 15 meses podría ser debida a una mayor absorción renal e intestinal de fosfato causada por la disminución en los niveles de Klotho.

1.2 AUMENTO DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE SENESCENCIA CELULAR EN CORTEZA RENAL DE RATONES DE 15 MESES (p53 y p16^{INK4a}).

Para estudiar el efecto de la hiperfosfatemia sobre la senescencia de las células renales en los ratones anteriormente analizados se evaluó la expresión de p53 y p16^{INK4a} en corteza renal aislada de ratones de 3 meses y de 15 meses.

Se analizó la expresión de la proteína p53 mediante técnicas de western-blot, observándose un ligero aumento estadísticamente no significativo en ratones de 15 meses (Figura 4).

En el caso de la expresión de p16^{INK4a} se observó un aumento significativo de sus niveles de expresión en los ratones de 15 meses. (Figura 4).

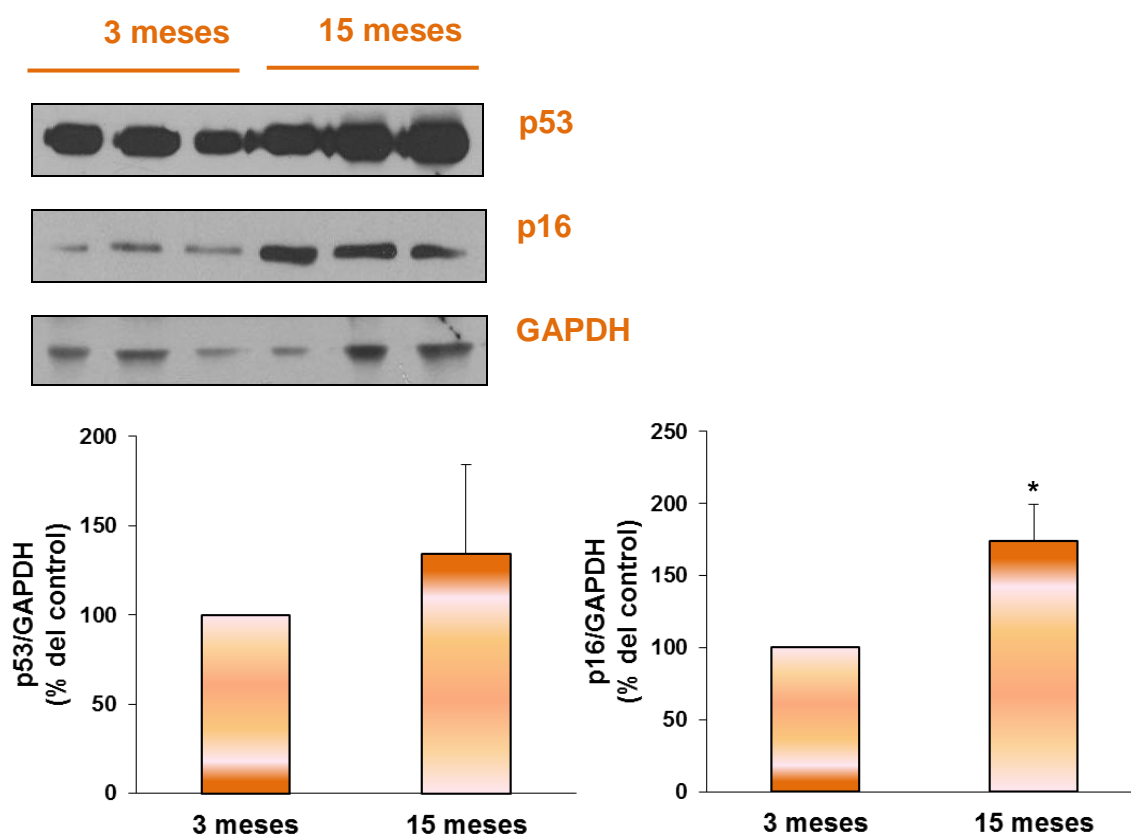


Figura 4. Aumento en la expresión de p53 y p16^{INK4a} en ratones de 15 meses. Análisis de los niveles de p53 y p16^{INK4a} en corteza renal de ratones de 3 y 15 meses. Arriba se muestra un blot representativo. Abajo se muestra el análisis densitométrico de los niveles de p53 y p16^{INK4a} respectivamente de todos los animales. Los resultados son la media ± error estándar de 10 animales. *p < 0.05 vs 3 meses.

1.3 RATONES DE 15 MESES CONTIENEN ELEVADOS NIVELES DE ILK EN CORTEZA RENAL.

En primer lugar se analizaron los valores de ILK en los grupos de ratones de 3 y 15 meses mediante RT-qPCR, observándose un aumento significativo de ILK en ratones de 15 meses (Figura 5A). Cuando se compararon los niveles de ILK y los niveles de fosfato en suero se observó una correlación positiva estadísticamente significativa (Figura 5B). Mientras que cuando comparamos los niveles de ILK y Klotho se observó la existencia de una correlación negativa estadísticamente significativa (Figura 5C).

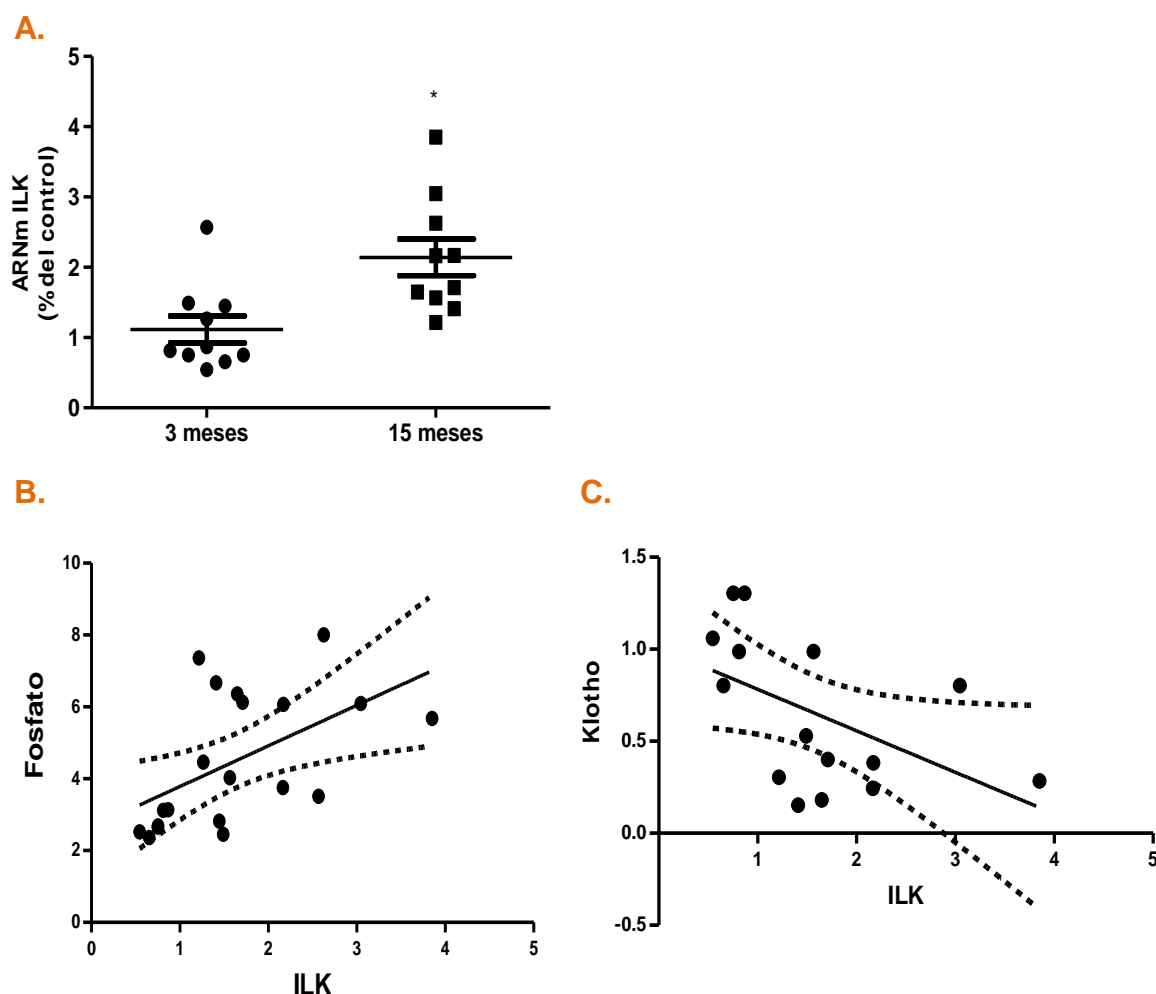


Figura 5. Los niveles de ILK se encuentran aumentados en el envejecimiento. (A) Determinación de los niveles de ARNm de ILK en animales de 3 meses (n=10) y 15 meses (n=10). *p<0.05 vs 3 meses. **(B)** Análisis estadístico de la relación entre los niveles de ILK y fosfato en suero mediante regresión simple. p<0.05. $r^2 = 0.2877$. **(C)** Análisis estadístico de la relación entre los niveles de ILK y Klotho mediante regresión simple. p<0.05. $r^2 = 0.2591$.

En resumen:

- La hiperfosfatemia podría ser debida a una alteración del eje Klotho/FGF23. La disminución de los niveles de Klotho podría ser la responsable de que se produzca una mayor absorción de fosfato a nivel renal.
- Ratones de 15 meses presentan niveles elevados de fosfato en sangre que vienen acompañados por un aumento en los niveles de las proteínas implicadas en el proceso de senescencia celular (p53 y p16^{INK4a}) y un aumento en los niveles de ILK a nivel de corteza renal.

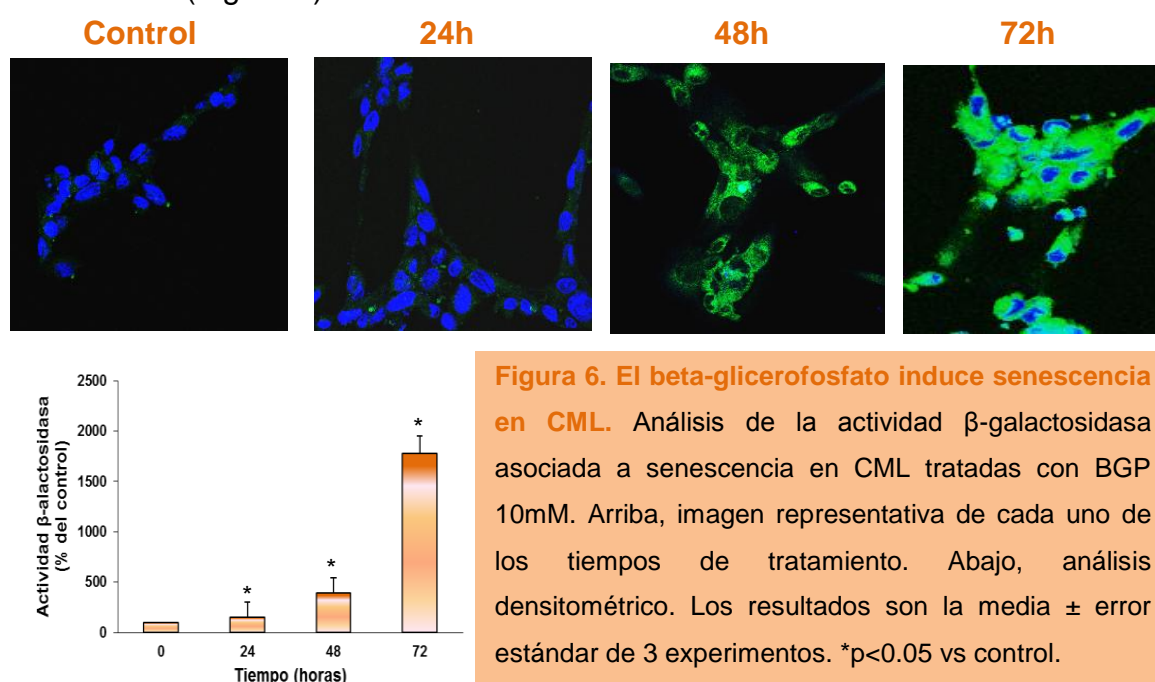
2. ESTUDIO *IN VITRO* DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE SENESCENCIA CELULAR. PAPEL DE ILK.

2.1 ALTOS NIVELES DE FOSFATO INDUCEN UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE ILK Y SENESCENCIA CELULAR A NIVEL VASCULAR.

Para estudiar si la hiperfosfatemia está implicada en el proceso de senescencia celular y si entre los mecanismos implicados en este proceso juega un papel importante ILK, se trataron con altos niveles de fosfato células de músculo liso de aorta humanas (CML). Estas células presentan el transportador de fosfato dependiente de sodio tipo III (Pit-1), pudiendo incorporar el fosfato al interior celular.

2.1.1 EL BETA-GLICEROFOSFATO INDUCE SENESCENCIA EN CELULAS VASCULARES DE MUSCULO LISO HUMANAS A TRAVÉS DE LA VIA $p53$ Y $p16^{INK4a}$.

Se utilizó beta-glicerofosfato (BGP) como fuente exógena de fosfato. En primer lugar se determinó si el BGP induce senescencia en CML mediante tinción con β -gal. Para ello se trataron células CML con BGP 10mM en ausencia de suero fetal bovino a distintos tiempos. La actividad β -galactosidasa se incrementó de forma tiempo-dependiente presentando un máximo a las 72h de tratamiento (Figura 6).



Para comprobar si el aumento de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia era específico de los altos niveles de fosfato se usó un inhibidor del transportador de fosfato Pit-1, el ácido fosfonofórmico (PFA). Cuando las células se trataron con PFA 0.5mM antes de añadir el BGP, se previno el aumento de la actividad β -galactosidasa inducida por BGP (Figura 7).

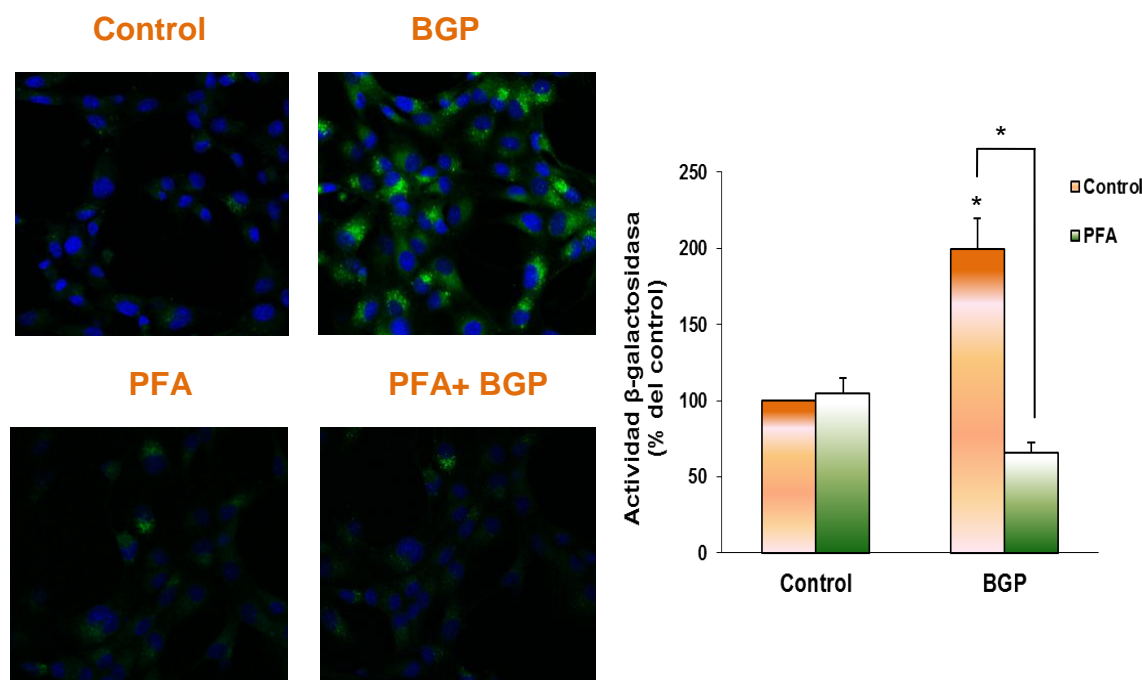


Figura 7. El ácido fosfonofórmico previene de la senescencia inducida por beta-glicerofofosfato. Determinación de la actividad β -galactosidasa en CML tratadas con PFA 0.5mM y BGP 10 mM durante 48h. A la izquierda imagen representativa de cada uno de los tratamientos. A la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

A continuación se analizaron las vías de senescencia implicadas en el efecto del BGP. En primer lugar se analizó la expresión de p53 y su diana transcripcional p21 mediante western-blot. En el caso de p53 el BGP produjo un aumento significativo en su expresión de forma tiempo-dependiente a partir de las 24h de tratamiento. Los niveles de p21 también aumentaron con el tratamiento de forma tiempo-dependiente siendo su aumento significativo a las 72h (Figura 8). En el caso de p16^{INK4a}, el tratamiento con BGP indujo un aumento significativo en su expresión a las 24h que se mantuvo en el tiempo (Figura 8).

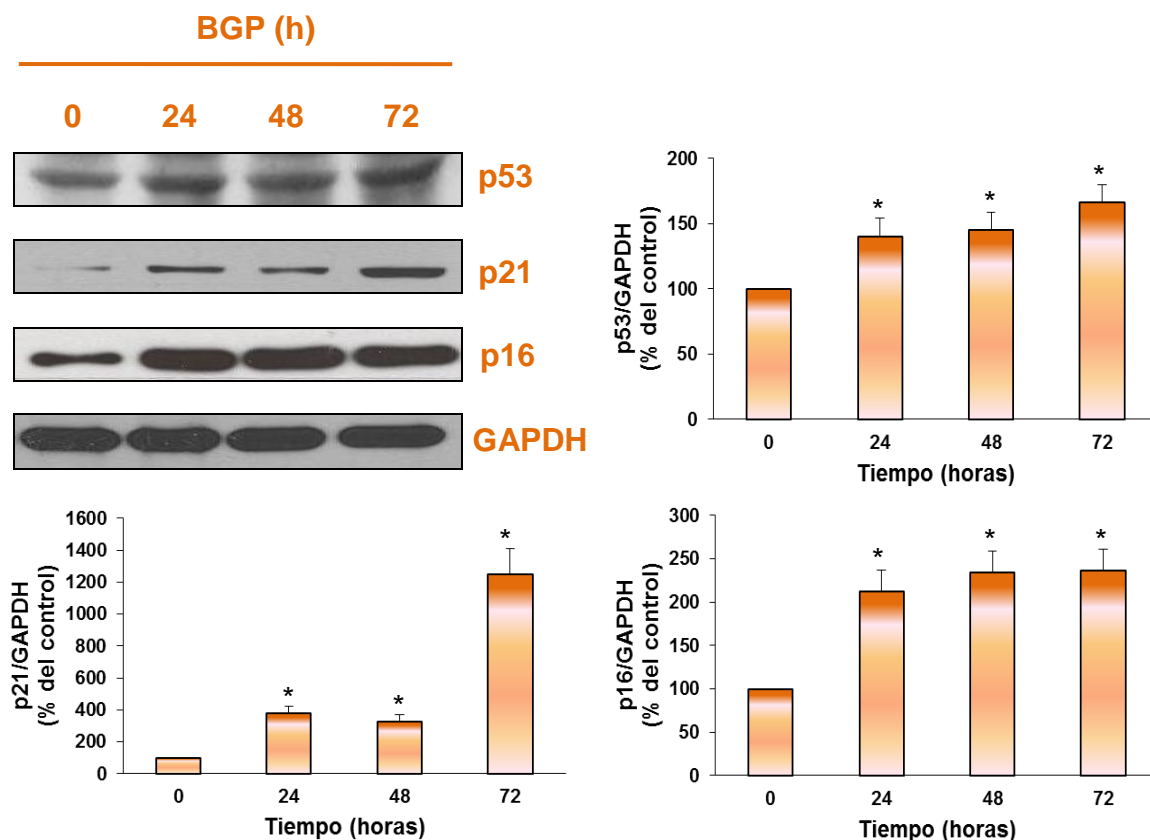


Figura 8. El tratamiento con beta-glicerofosfato induce senescencia vía p53 y p16^{INK4a}.

Determinación de los niveles de p53, p21 y p16^{INK4a} en CML tratadas con BGP 10 mM durante a distintos tiempos. A la izquierda se muestra un blot representativo. A la derecha y abajo, análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control.

El tratamiento previo con 0.5mM de PFA previno el aumento de p53 y p16^{INK4a} inducido por BGP (Figura 9).

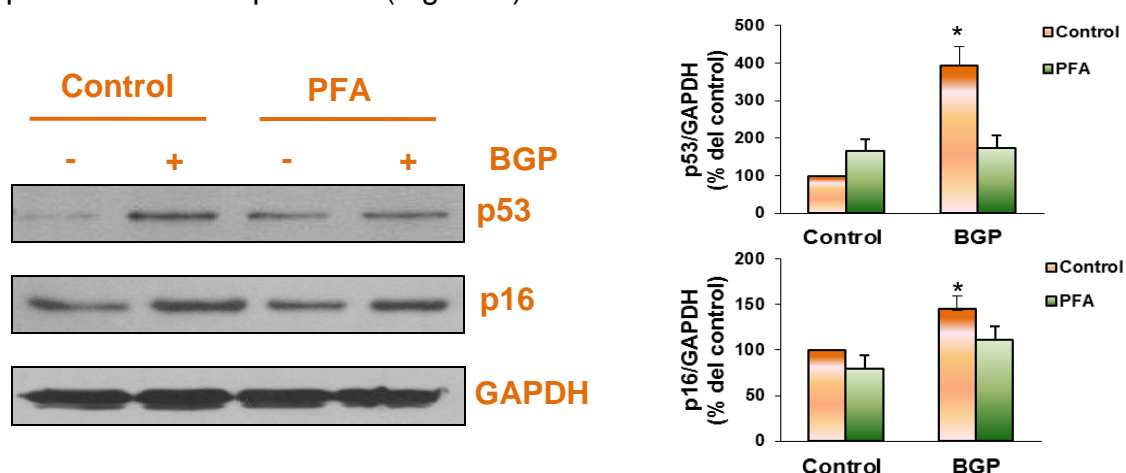


Figura 9. El tratamiento con PFA previno el aumento de ILK, p53 y p16^{INK4a}. Medición de los niveles de p53 y p16^{INK4a} en células CML tratadas con PFA 0.5mM y BGP 10mM durante 48h. A la izquierda blot representativo. A la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control.

2.1.2. LA SENESCENCIA INDUCIDA POR EL BETA-GLICEROFOSFATO ES DEPENDIENTE DE ILK.

Para estudiar si los altos niveles de fosfato producían un aumento en los niveles de ILK se trataron células CML con BGP 10mM y se analizaron los niveles de expresión de ILK y su actividad. La actividad quinasa se determinó de forma indirecta mediante el análisis de los niveles de fosforilación en la Serina 9 de GSK-3 β , uno de sus principales sustratos. La expresión de ILK aumentó a las 24h de tratamiento siendo estadísticamente significativo a las 48h mientras que la actividad de ILK aumentó a las 24h de tratamiento (Figura 10).

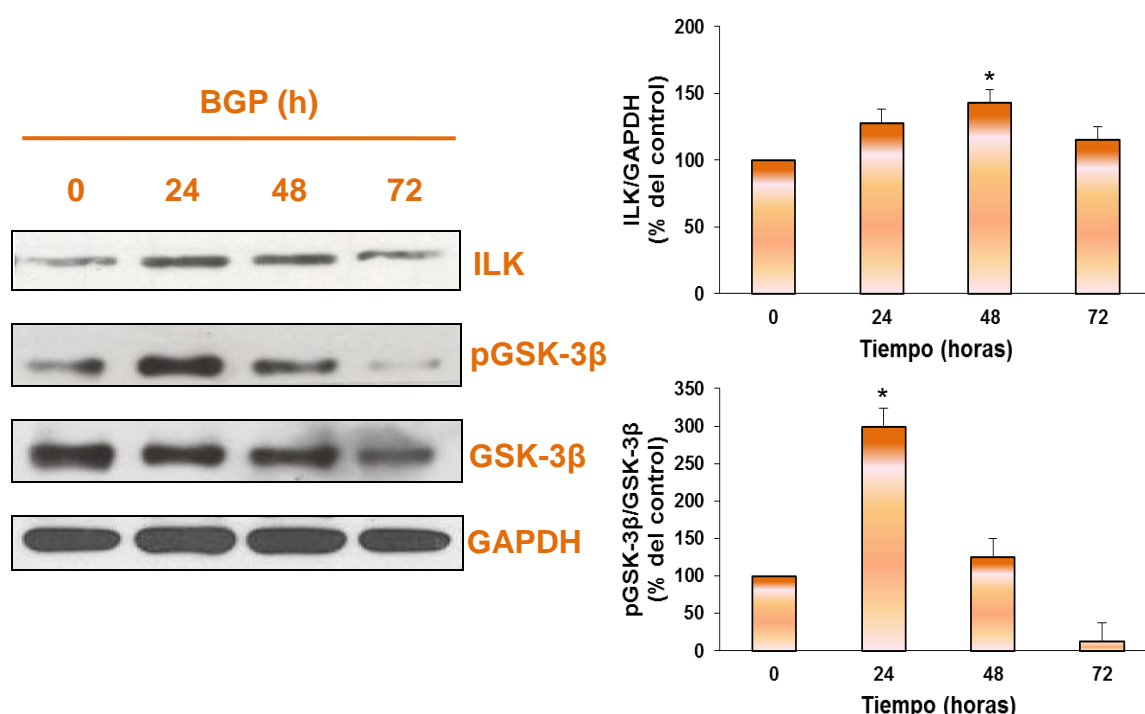


Figura 10. El tratamiento con BGP produce aumento en los niveles de ILK y de su actividad quinasa. Estudio de la expresión de ILK y de pGSK-3 β en células tratadas con BGP 10mM a distintos tiempos. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

Una vez observado el incremento en la actividad y la expresión de ILK por efecto del BGP, se realizaron transfecciones en las CML con un ARN de interferencia específico para ILK con el objetivo de silenciar su expresión y evaluar si la senescencia inducida por BGP es dependiente de ILK. Para comprobar si hubo silenciamiento de ILK se analizó su expresión y su actividad quinasa, pudiéndose observar un descenso en la expresión de ILK y en la

fosforilación de GSK-3 β (Ser 9) en presencia del tratamiento a diferencia de las transfectadas con un ARN de interferencia sin diana. Cuando se trataron con BGP 10mM las células transfectadas con el ARN de interferencia de ILK (*siRNA ILK*) no se observó ningún aumento en la expresión de las proteínas p53 y p16^{INK4a} (Figura 11).

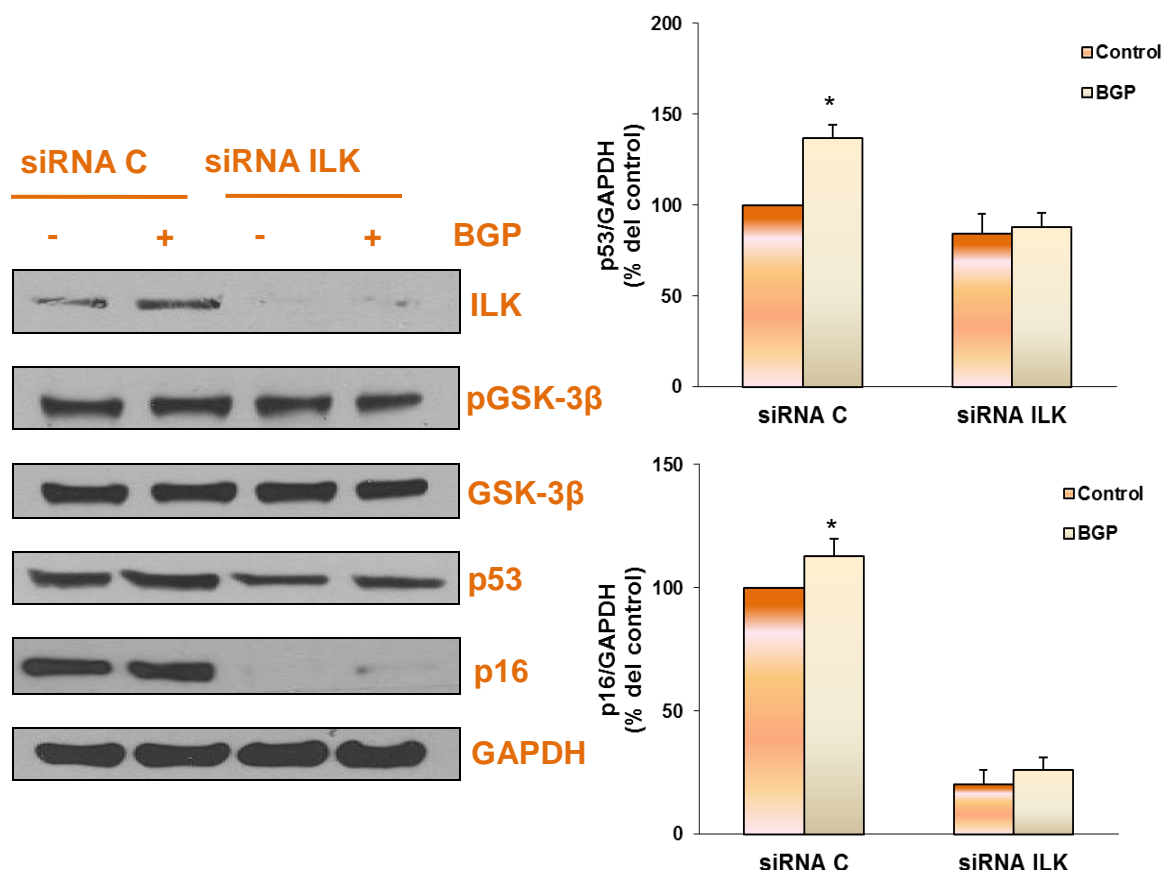


Figura 11. El silenciamiento de ILK revierte el aumento en la expresión de p53 y p16^{INK4a} inducido por BGP. Análisis de la expresión de los niveles de p53 y p16^{INK4a} en células CML transfectadas con ARN de interferencia contra ILK 20nM (*siRNA ILK*) o ARN sin diana (*siRNA C*) y tratadas con BGP 10mM durante 48h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

Estos datos mostraron que la presencia de ILK es necesaria para que se produzca el aumento en la expresión de ambas proteínas implicadas en el proceso de senescencia. Además, se observó mediante tinción con β -gal, que el silenciamiento de ILK previno el aumento de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia inducida por el tratamiento con BGP a las 48h (Figura 12).

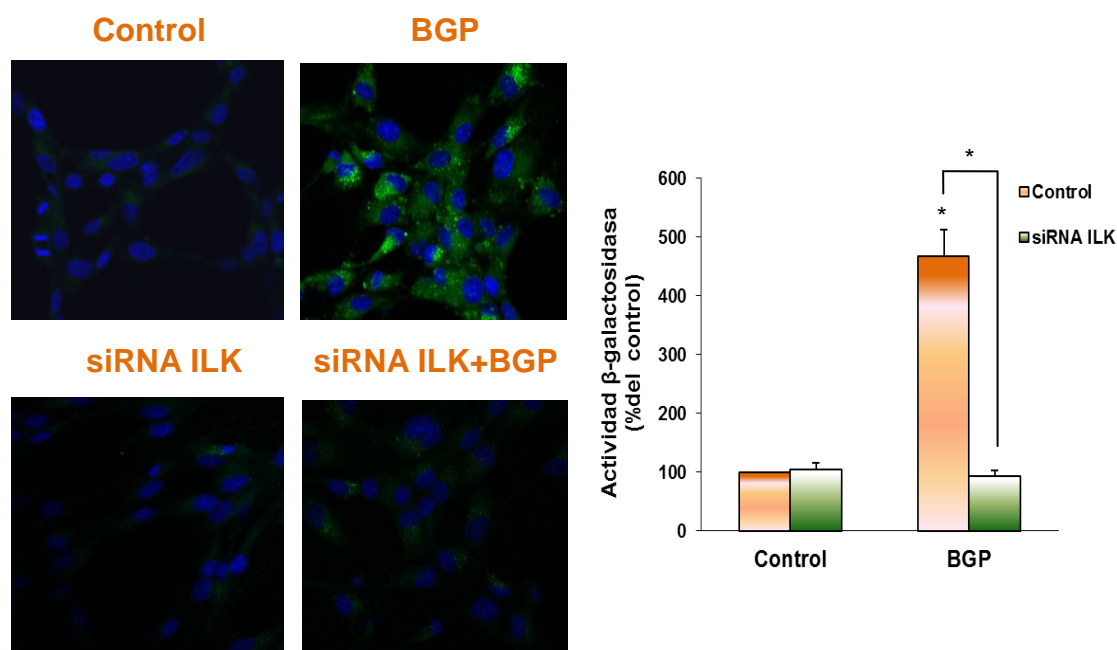


Figura 12. El silenciamiento de ILK previene de la senescencia inducida por beta-glicerofosfato. Análisis de la actividad β -galactosidasa en CML con ILK silenciada y tratadas con BGP 10 mM durante 48h. A la izquierda imagen representativa de cada uno de los tratamientos. A la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control.

2.1.3. LA SENESCENCIA CELULAR INDUCIDA POR BETA-GLICEROFOSFATO ES DEPENDIENTE DE LA VÍA PI3K-AKT-FOXO.

A continuación se analizaron las posibles vías implicadas en el proceso de senescencia celular mediado por ILK. Para ello se determinaron en primer lugar los niveles de fosforilación de uno de los efectores de la actividad quinasa de ILK junto con GSK-3 β , Akt en su Serina 473 (Delcommenne et al., 1998), así como los niveles de fosforilación del factor de transcripción FoxO, que fosforilado por Akt se encuentra inactivo. Cuando se incubaron células CML con BGP 10mM a distintos tiempos se observó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) a las 24h de tratamiento que decayó con el tiempo (Figura 13A). En el caso del factor de transcripción FoxO se observó un aumento significativo en su fosforilación a las 24h que luego volvió a niveles basales (Figura 13B). Para comprobar que la activación de Akt es dependiente de ILK se transfectaron CML con un ARN de interferencia específico para ILK, pudiéndose observar como al silenciar la expresión de ILK no se producía el aumento en la fosforilación de Akt (Ser 473) en presencia de BGP (Figura 14).

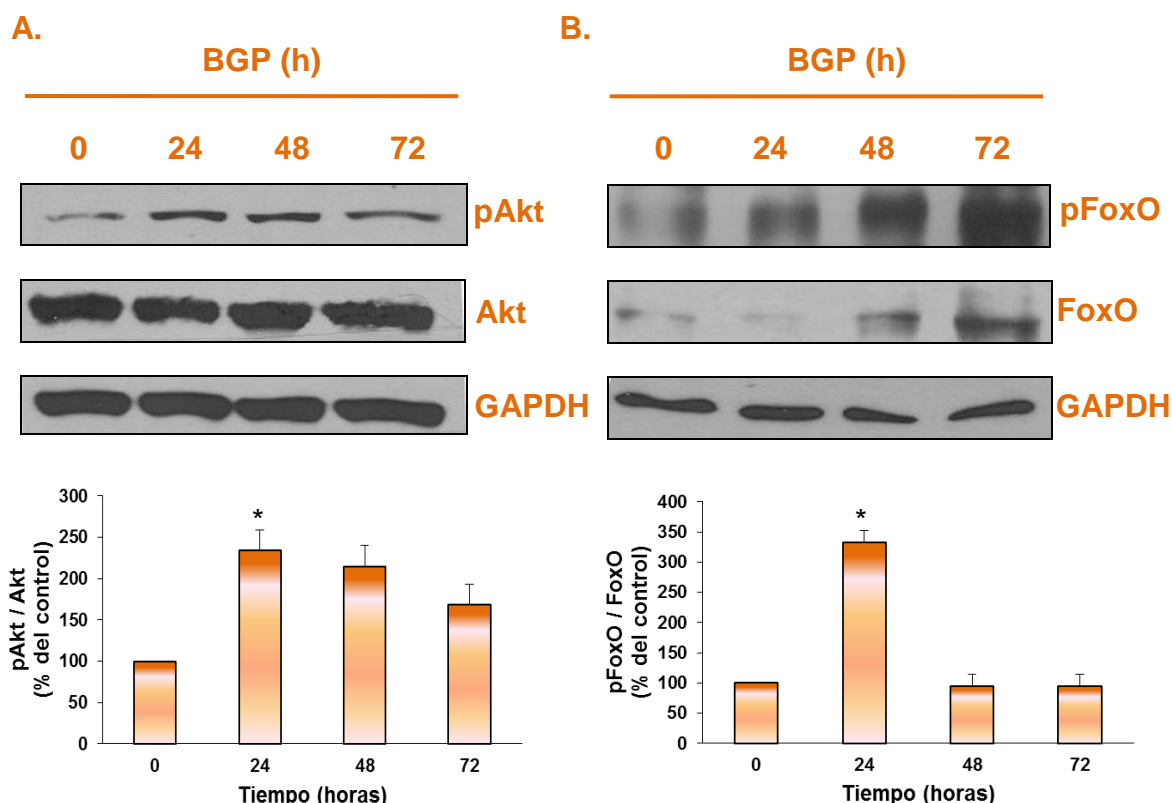


Figura 13. El BGP induce la fosforilación de Akt y FoxO. (A) Análisis de la fosforilación de Akt en su serina 473 tras tratamiento con BGP 10mM hasta 72h. (B).Análisis de la fosforilación de FoxO en CML tratadas con BGP 10mM hasta las 72h. Arriba se muestra blot representativo y abajo el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control

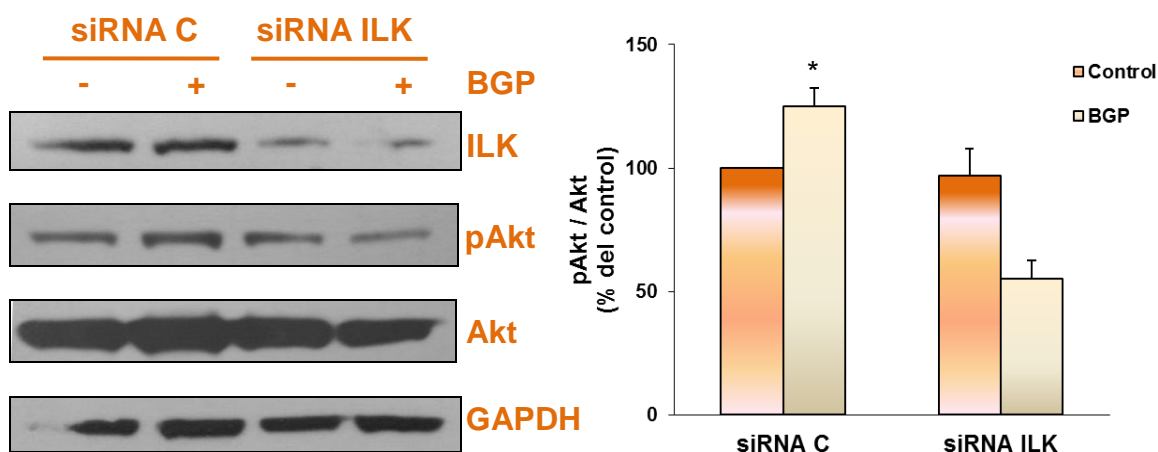


Figura 14. El silenciamiento de ILK revierte la fosforilación de Akt inducida por BGP. Análisis de la expresión de la fosforilación de Akt en la Serina 473 en CML transfectadas con ARN de interferencia contra ILK 20nM (siRNA ILK) o ARN sin diana (siRNA C) y tratadas con BGP 10mM durante 24h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control.

Para estudiar si el aumento de ILK inducido por BGP es dependiente de PI3K se preincubaron durante 15 minutos células CML con 30 μ M de LY294002 (LY), un inhibidor farmacológico de PI3K. Se observó que el tratamiento con LY previno el aumento en los niveles de expresión de ILK y de su actividad, determinada por la fosforilación de Akt en su Serina 473, en presencia del tratamiento. También se pudo comprobar que la ausencia de aumento en los niveles de ILK y de su actividad vino acompañada por una ausencia en el aumento de los niveles de expresión de las proteínas p53 y p16^{INK4a} implicadas en la senescencia celular (Figura 15).

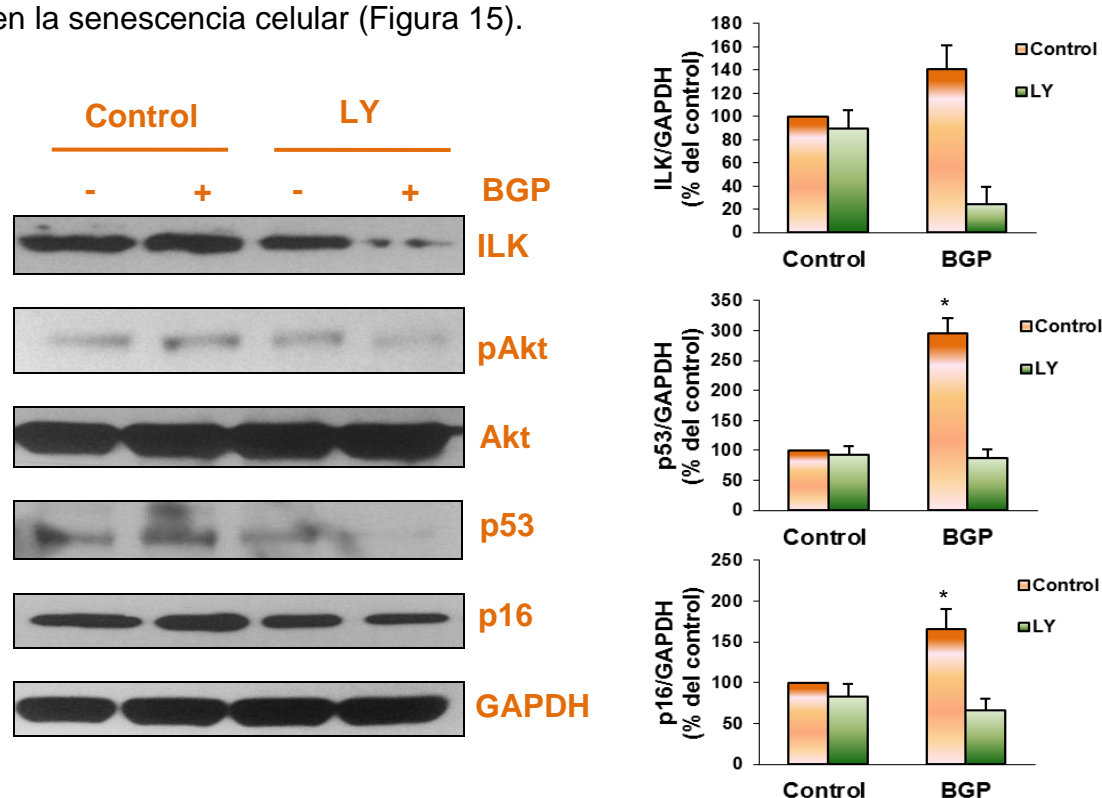


Figura 15. El tratamiento con el inhibidor de PI3K previno el aumento de ILK, p53 y p16^{INK4a} por BGP. Medición de los niveles de ILK, p53 y p16^{INK4a} en células CML tratadas con LY294002 30 μ M y BGP 10mM durante 24h. A la izquierda blot representativo. A la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

2.1.4. EL TRATAMIENTO CON BETA-GLICEROFOSFATO PRODUCE UN AUMENTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR DEPENDIENTE DE ILK.

Para analizar si el tratamiento con BGP producía una disminución en la capacidad antioxidante de la célula provocando una situación de estrés oxidativo se determinaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), de anión

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los niveles de GSH reducidos en CML tratadas con BGP 10mM. Los niveles de ROS aumentaron significativamente de forma tiempo-dependiente (Figura 16A). Los niveles de ($O_2^{\cdot-}$) se presentaron aumentados de forma significativa a las 48h de tratamiento (Figura 16B). Los niveles de GSH reducidos disminuyeron significativamente de forma tiempo-dependiente con el tratamiento (Figura 16C), indicando un desequilibrio a favor de la producción de oxidantes.

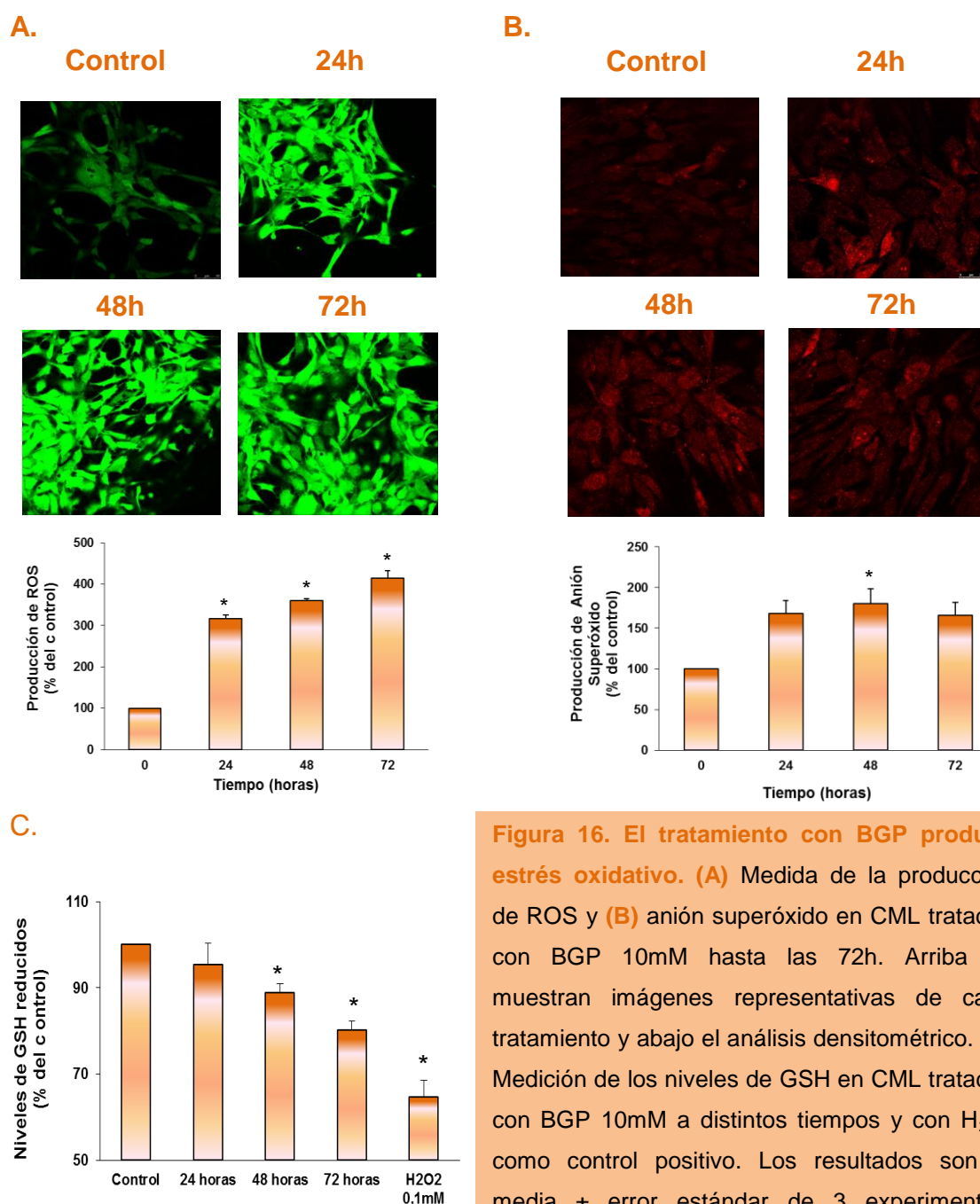


Figura 16. El tratamiento con BGP produce estrés oxidativo. (A) Medida de la producción de ROS y (B) anión superóxido en CML tratadas con BGP 10mM hasta las 72h. Arriba se muestran imágenes representativas de cada tratamiento y abajo el análisis densitométrico. (C) Medición de los niveles de GSH en CML tratadas con BGP 10mM a distintos tiempos y con H_2O_2 como control positivo. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control,

Para estudiar si el aumento en la expresión de ILK está ligado al aumento en la producción de oxidantes se transfectaron CML con un ARN de interferencia específico de ILK. Se observó que el silenciamiento de ILK inhibió tanto el aumento en los niveles de ROS (Figura 17A) como de anión superóxido (Figura 17B), así como la depleción de GSH por el tratamiento con BGP (Figura 17C).

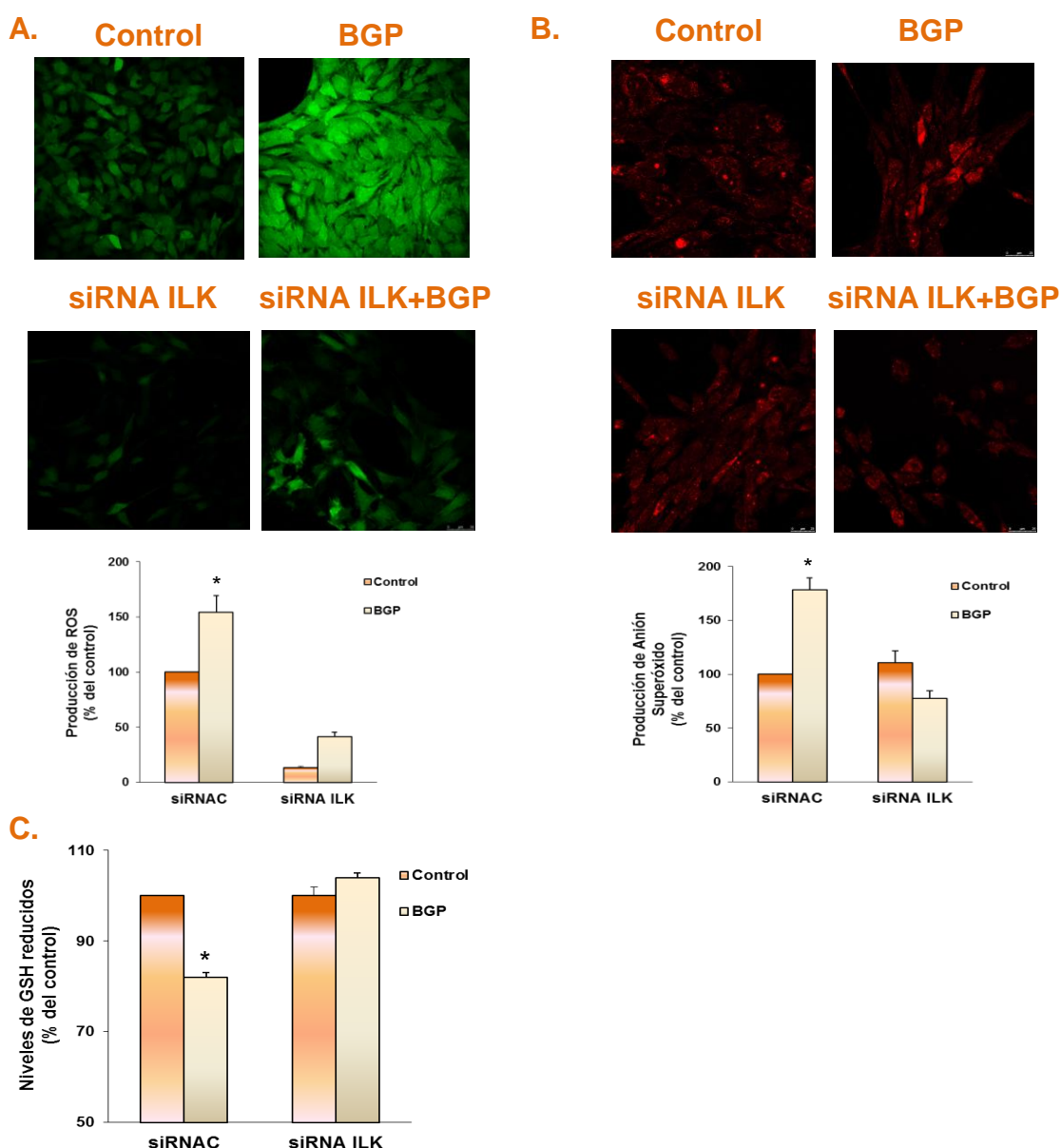


Figura 17. La delección de ILK previene del estrés oxidativo inducido por BGP (A) Determinación de los niveles de ROS en CML transfectadas con ARN de interferencia contra ILK 20nM (siRNA ILK) o ARN sin diana (siRNA C) y tratadas con BGP 10mM durante 48h. **(B)** Medida de la producción de anión superóxido en las mismas condiciones. Arriba se muestran imágenes representativas de cada tratamiento y abajo el análisis densitométrico. **(C)** Medición de los niveles de GSH reducido en CML con ILK deleccionada y tratadas con BGP 10mM a 48h. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

Para comprobar si la senescencia celular inducida por los altos niveles de fosfato y mediada por ILK era debida al estrés oxidativo, se analizaron los niveles de expresión de p53 y p16^{INK4a} tras añadir un compuesto antioxidante como es la N-acetil-cisteína (NAC) (10mM) o suplementando el medio con catalasa exógena (CAT) (160U/ml) durante 15 minutos de forma previa al tratamiento con BGP 10mM durante 48 horas.

El tratamiento previo con NAC antes de la adición de BGP inhibió el aumento tanto en los niveles de expresión de p53 como de p16^{INK4a}, sin embargo no se observó la prevención en el aumento de ILK (Figura 18).

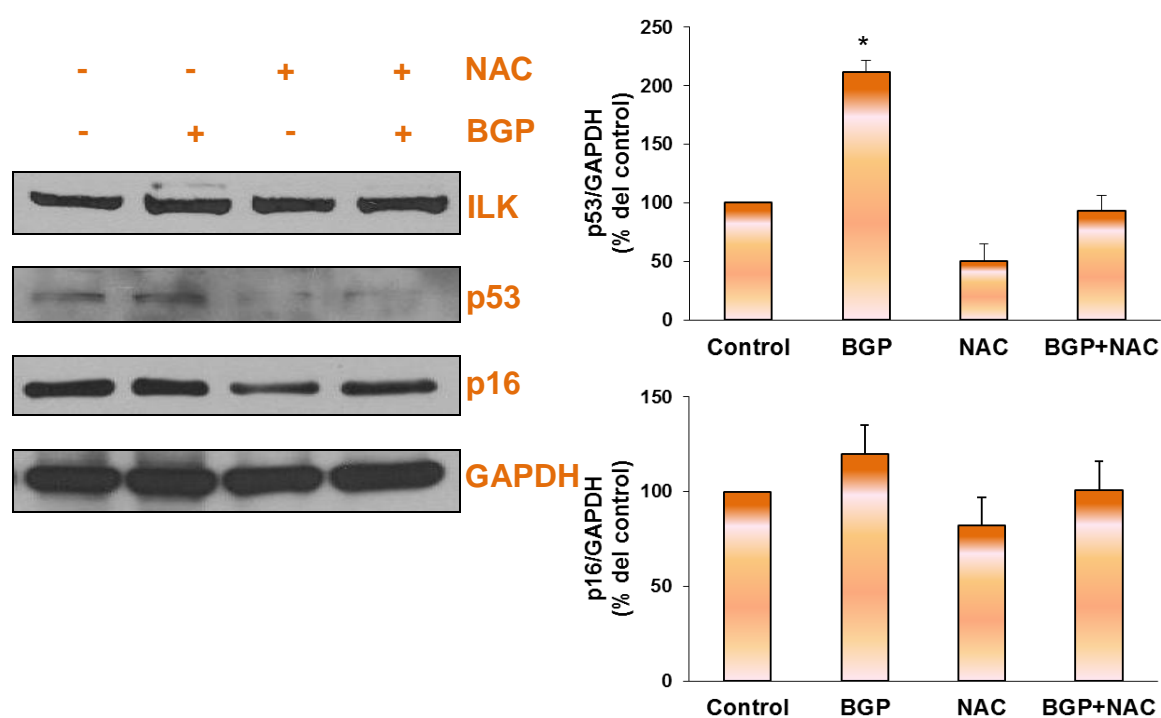


Figura 18. El tratamiento con NAC previno el aumento de p53 y p16^{INK4a} inducido por BGP. Medición de los niveles de ILK, p53 y p16^{INK4a} en células CML tratadas previamente con NAC 10mM durante 15 minutos y posteriormente con BGP 10mM durante 48h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media ± error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control,

Por otro lado, también se pudo observar cómo la adición de catalasa exógena 160 U/ml al medio de cultivo impedía el aumento de la expresión de las proteínas p53 y p16^{INK4a} en presencia de BGP (Figura 19). Ambos resultados

muestran como la senescencia celular es consecuencia de un estado de estrés oxidativo dependiente del aumento en la expresión de ILK.

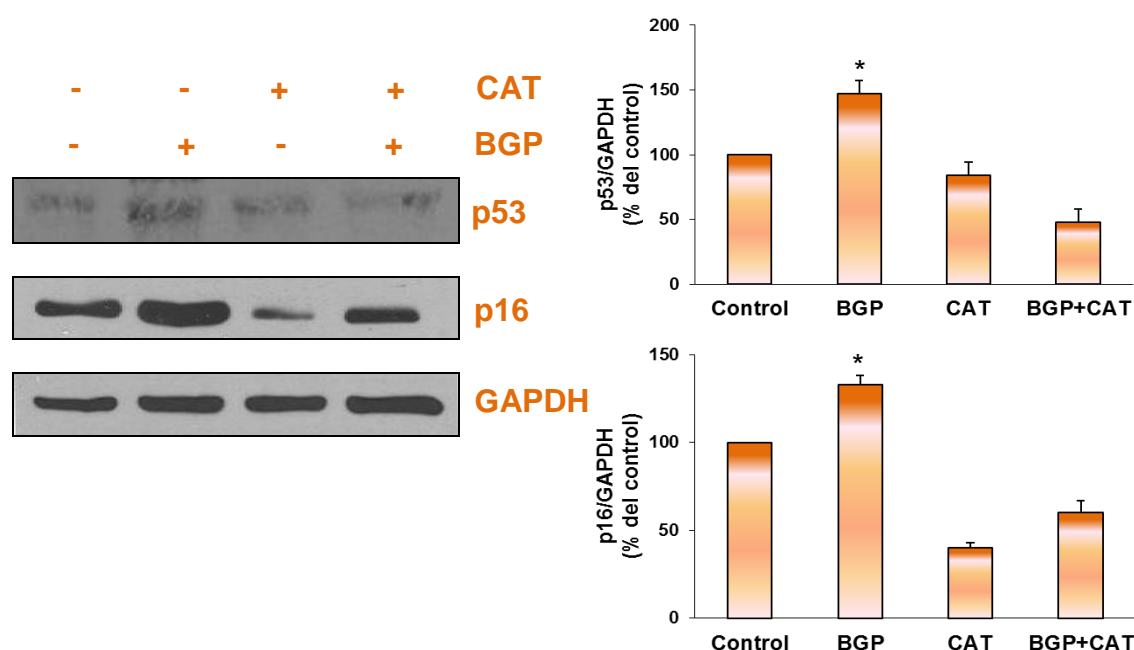


Figura 19. La adición de catalasa exógena previno el aumento de p53 y p16^{INK4a} inducido por BGP. Análisis de los niveles de p53 y p16^{INK4a} en células CML tratadas con CAT 160U/ml y BGP 10mM durante 48h. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

2.1.5 LA DIETA ALTA EN FOSFATO INDUCE AUMENTO EN LOS NIVELES DE ILK *IN VIVO*.

Para establecer si existe relación *in vivo* entre los altos niveles de fosfato, el aumento de expresión de ILK y la senescencia, empleamos un modelo *in vivo* de calcificación vascular. Para ello, se analizaron los niveles de ILK, p53 y p16^{INK4a} en muestras de aorta de ratas Wistar a las cuales se les había sometido a una nefrectomía 5/6 y se les había administrado una dieta rica en fosfato durante 12 semanas (PA) frente a ratas a las cuales se les había sometido a la cirugía pero se les administró una dieta normal en fosfato (Control).

Los niveles de ILK y proteínas implicadas en el proceso de senescencia fueron analizados mediante western-blot en el extracto proteico de aortas aisladas de ambos grupos de animales, pudiéndose observar un aumento significativo en la expresión de ILK en las ratas con la dieta rica en fosfato. Este

aumento en los niveles de ILK vino acompañado de un aumento en la expresión de los niveles de p53 y p16^{INK4a} estadísticamente significativos (Figura 20).

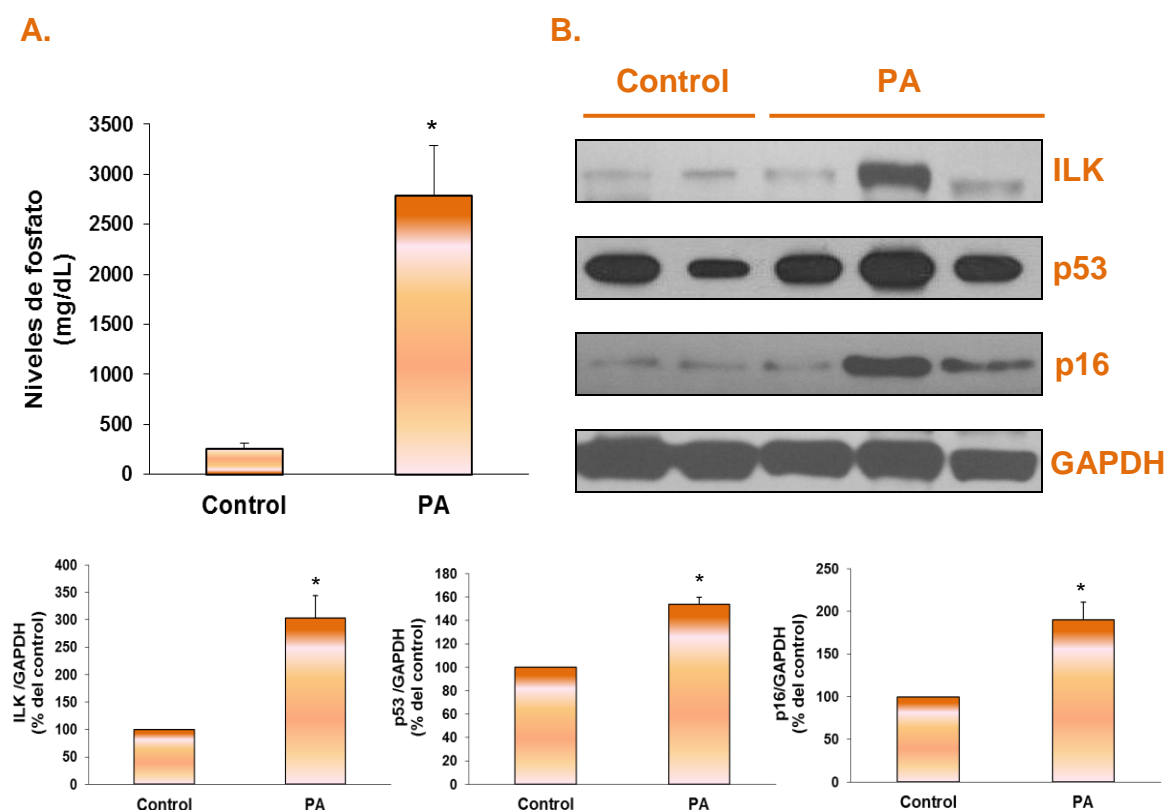


Figura 20. Los animales con la dieta rica en fosfato presentan elevados niveles de ILK. **(A)** Niveles de fosfato en sangre (mg/ml) en ratas con nefrectomía 5/6 alimentados con dieta normal (Control) o animales con dieta alta en fosfato. **(B)** Análisis de la expresión de ILK en aorta de ratas con nefrectomía 5/6 alimentados con dieta normal (Control) o dieta alta en fosfatos (PA). A la derecha se muestra un blot representativo y abajo se muestra el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de una n=5 animales control y n=6 animales PA. *p<0.05 vs control.

En resumen:

- El beta-glicerofosfato induce senescencia celular en CML a través de la vía p53-p21 y p16^{INK4a}.
- El tratamiento con beta-glicerofosfato induce aumento en la expresión de ILK y de su actividad quinasa.
- El aumento en los niveles de ILK es dependiente de PI3K y produce un aumento en la vía de señalización Akt-FoxO.

- El tratamiento con BGP induce un desequilibrio oxidación/reducción con aumento en la producción de ROS y anión superóxido y una disminución en los niveles de GSH reducidos. Este desequilibrio quizás pueda ser debido a que la fosforilación de FoxO produce una disminución en la producción de enzimas antioxidantes como son catalasa o superóxido dismutasa.
- La senescencia celular inducida por el beta-glicerofosfato es consecuencia final de una situación de estrés oxidativo dependiente de ILK (Figura 21).

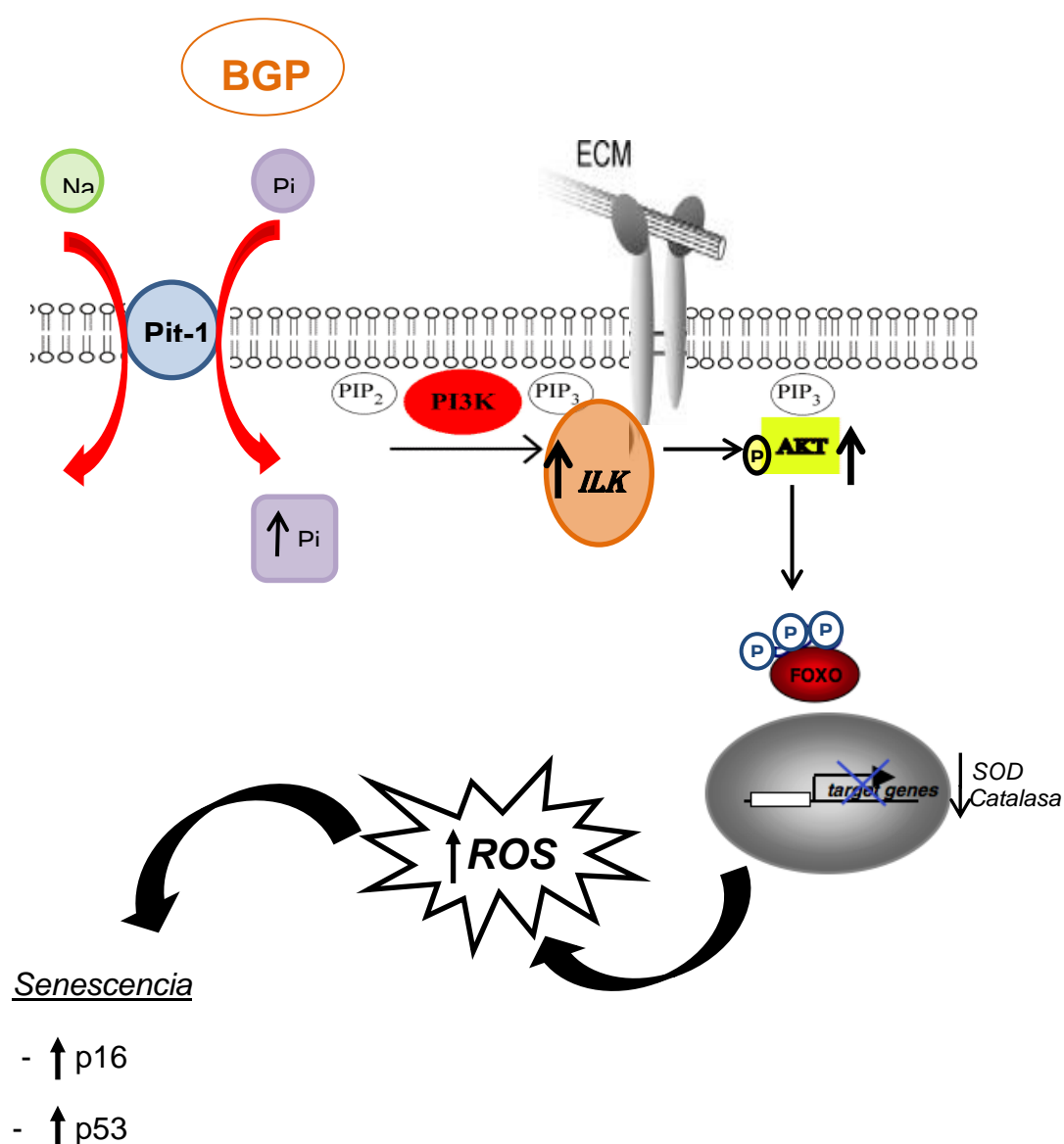


Figura 21. Modelo propuesto de las vías implicadas en la inducción de senescencia en células CML tras el tratamiento con el beta-glicerofosfato

2.2 DISTINTOS ESTIMULOS SENESCENTES INDUCEN UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE ILK EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS Y CELULAS TUBULARES DE RATÓN.

2.2.1 LA ALBUMINA GLICOSILADA Y LA GLUCOSA OXIDASA INDUCEN SENESCENCIA EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS Y CELULAS TUBULARES DE RATÓN.

Para comprobar si la albumina glicosilada (AG) induce senescencia celular se estudió la expresión de p53 en células mesangiales humanas (CMH) y células tubulares de ratón (CTM) tratadas con 100µg/ml de AG a diferentes tiempos en ausencia de suero fetal bovino. El tratamiento con AG produjo un aumento en la expresión de p53 tiempo-dependiente, observándose un aumento significativo a partir de las 24h de tratamiento en el caso de las CMH (Figura 24A) y a partir de las 48h en el caso de las CTM (Figura 24B).

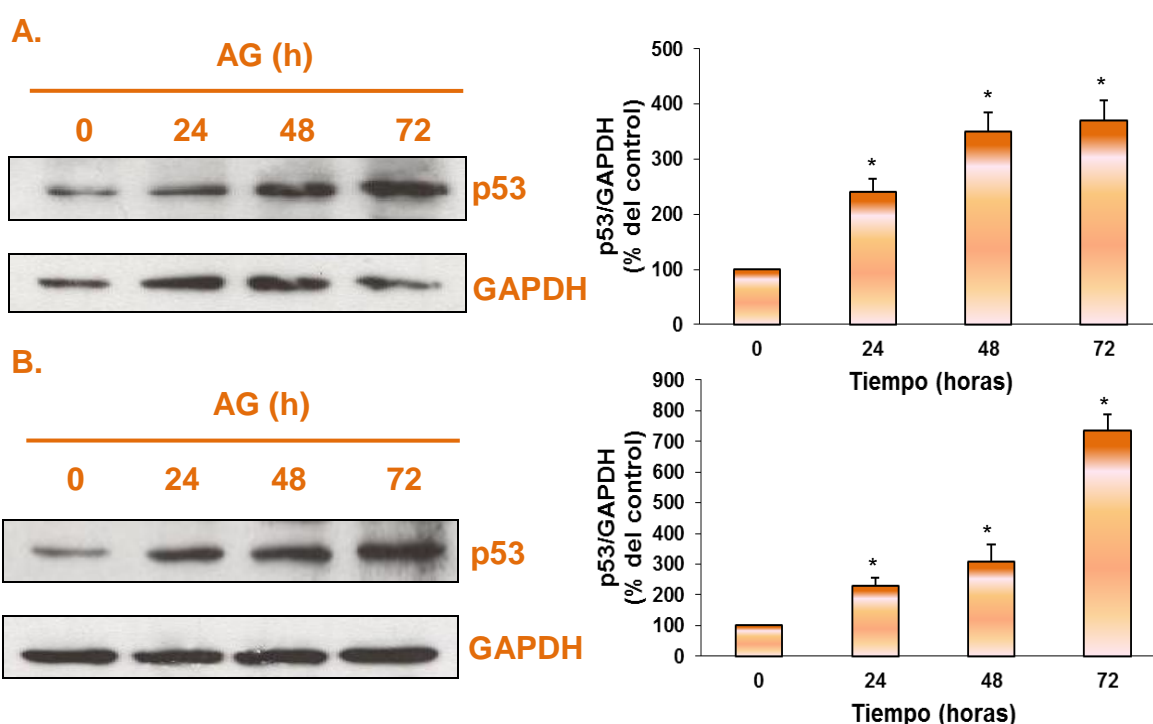


Figura 24. El tratamiento con AG aumentó la expresión de p53 de manera tiempo-dependiente. (A) y (B) Análisis de los niveles de p53 en CMH y CMT tratadas con AG 100µg/ml hasta 72 horas. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

A continuación, se analizó si la glucosa oxidasa (GOx) inducía senescencia celular en células CTM. Para ello, se trataron CTM con GOx a una dosis de 2mU/ml hasta 72 horas en ausencia de suero fetal bovino y se analizó la vía de senescencia de p53 mediante western-blot. El tratamiento con GOx indujo un aumento en los niveles de p53 estadísticamente significativo a las 72h de tratamiento (Figura 25).

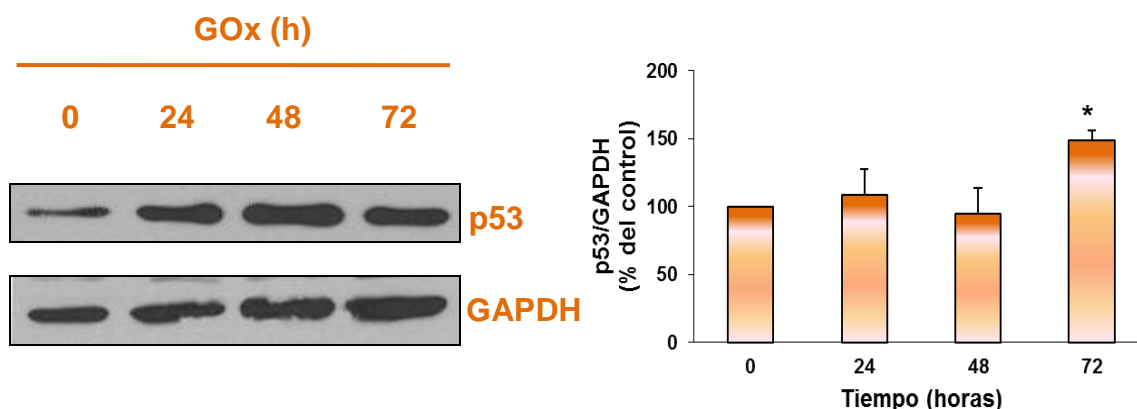


Figura 25. La GOx produjo un aumento en los niveles de p53. Estudio de la expresión de p53 en células CTM tratadas con 2mU/ml de GOx de forma tiempo-respuesta. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control.

2.2.2 EL TRATAMIENTO CON ALBUMINA GLICOSILADA Y GLUCOSA OXIDASA PRODUCE UN AUMENTO EN LA EXPRESION DE ILK EN CÉLULAS MENSAGIALES HUMANAS Y CELULAS TUBULARES DE RATÓN.

En primer lugar se analizó el efecto que presentaba el tratamiento con AG sobre la expresión de ILK y su actividad mediante la determinación de los niveles de GSK-3 β fosforilada en la Serina 9. El tratamiento con AG produjo un aumento en los niveles de ILK en células CMH significativo a partir de las 24h, así como un aumento en los niveles de GSK-3 β fosforilada frente a la total, siendo significativo a las 48h (Figura 26A). En el caso de las células CTM la AG también indujo un aumento en los niveles de ILK y en su actividad significativo a partir de las 24h del tratamiento (Figura 26B).

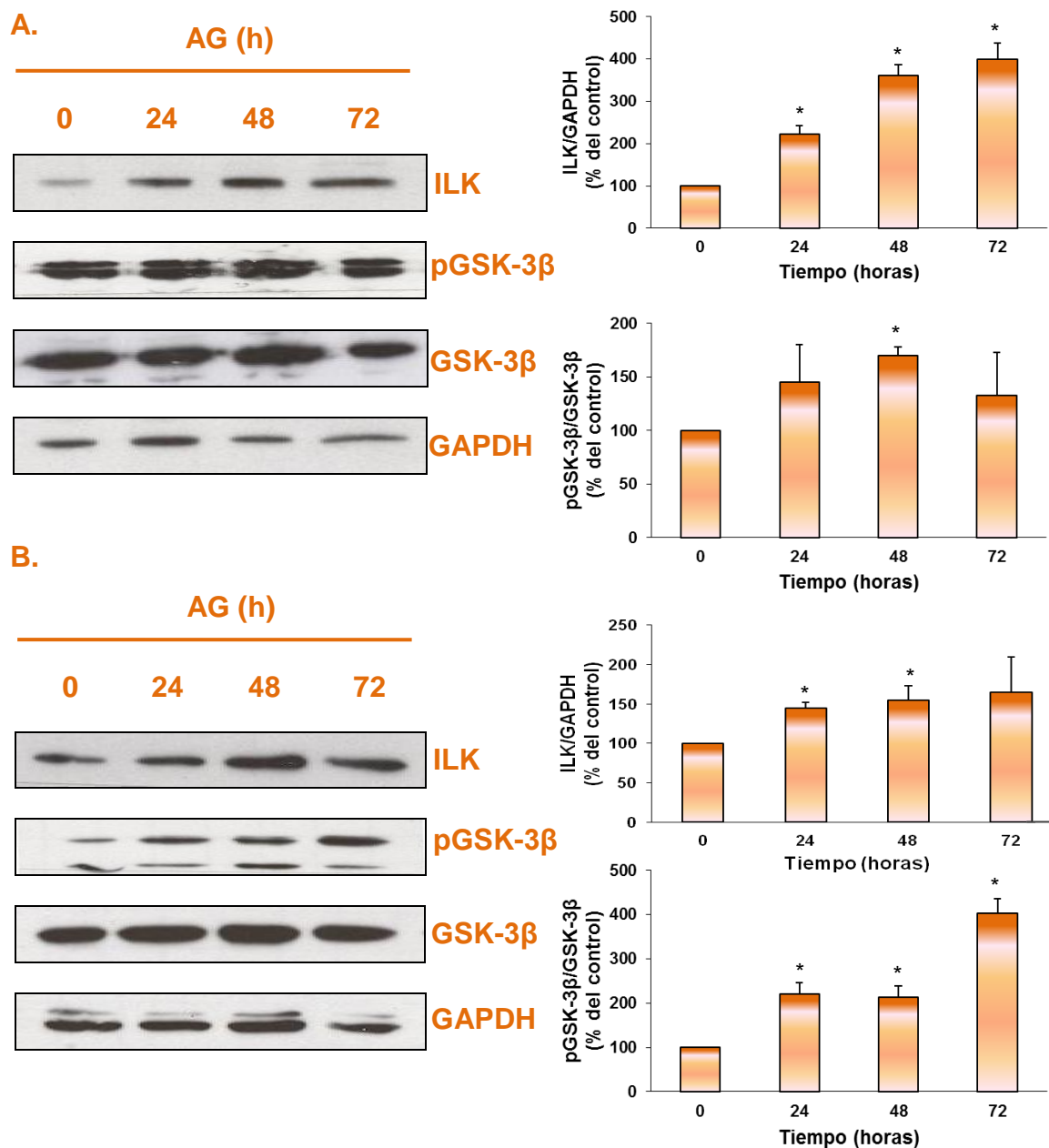


Figura 26. El tratamiento con AG indujo un aumento en los niveles de ILK y también un incremento en su actividad. **(A)** Estudio de la expresión de ILK y de pGSK3β en células CMH tratadas con AG 100μg/ml de manera tiempo-respuesta. **(B)** Estudio de la expresión de ILK y de pGSK3β en células CTM tratadas con AG 100μg/ml de manera tiempo-respuesta. A la izquierda se muestra un blot representativo y a la derecha el análisis densitométrico. Los resultados son la media ± error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

Cuando tratamos células CTM con GOx, también se pudo observar como dicho estímulo senescente indujo un aumento tanto en los niveles de ILK como

de su actividad quinasa. Los niveles de ILK aumentaron a las 48h tras tratamiento, mientras que los niveles de pGSK-3 β (Ser 9) aumentaron a las 24h después de añadir el tratamiento (Figura 27).

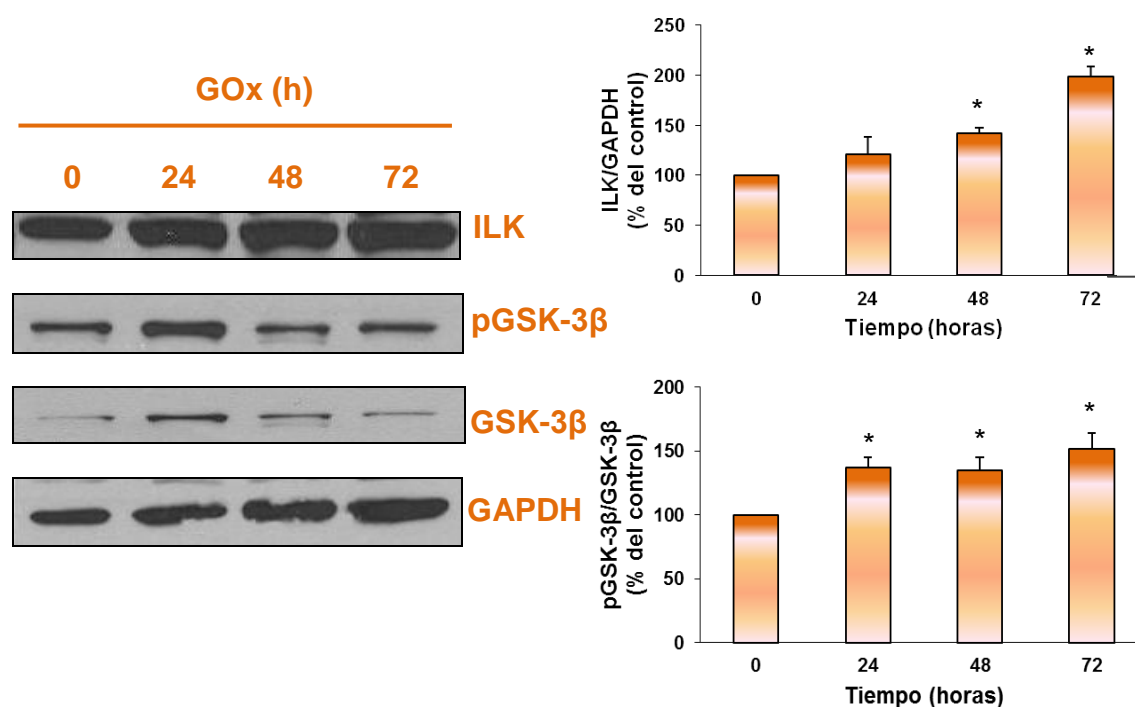


Figura 27. El tratamiento con GOx produce aumento en los niveles de ILK así como una inducción de su actividad. Determinación de los niveles de ILK y de pGSK-3 β en células tratadas con GOx 2mU/ml a distintos tiempos. A la izquierda se muestra un blot y a la derecha el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. *p<0.05 vs control.

2.2.3 LA SENESCENCIA INDUCIDA POR ALBUMINA GLICOSILADA ES DEPENDIENTE DE ILK.

Con el propósito de estudiar la importancia de ILK en el proceso de senescencia celular, se analizó si el efecto de AG sobre p53 era dependiente de ILK mediante la realización de transfecciones en las CMH y CTM con un ARN de interferencia específico de ILK que silenció su expresión. En ambas estirpes celulares se pudo observar que al silenciar la expresión de ILK con el ARN de interferencia (*siRNA ILK*) no se producía el aumento en los niveles de p53 tras el tratamiento con AG 100 μ g/ml durante 48h (Figura 28).

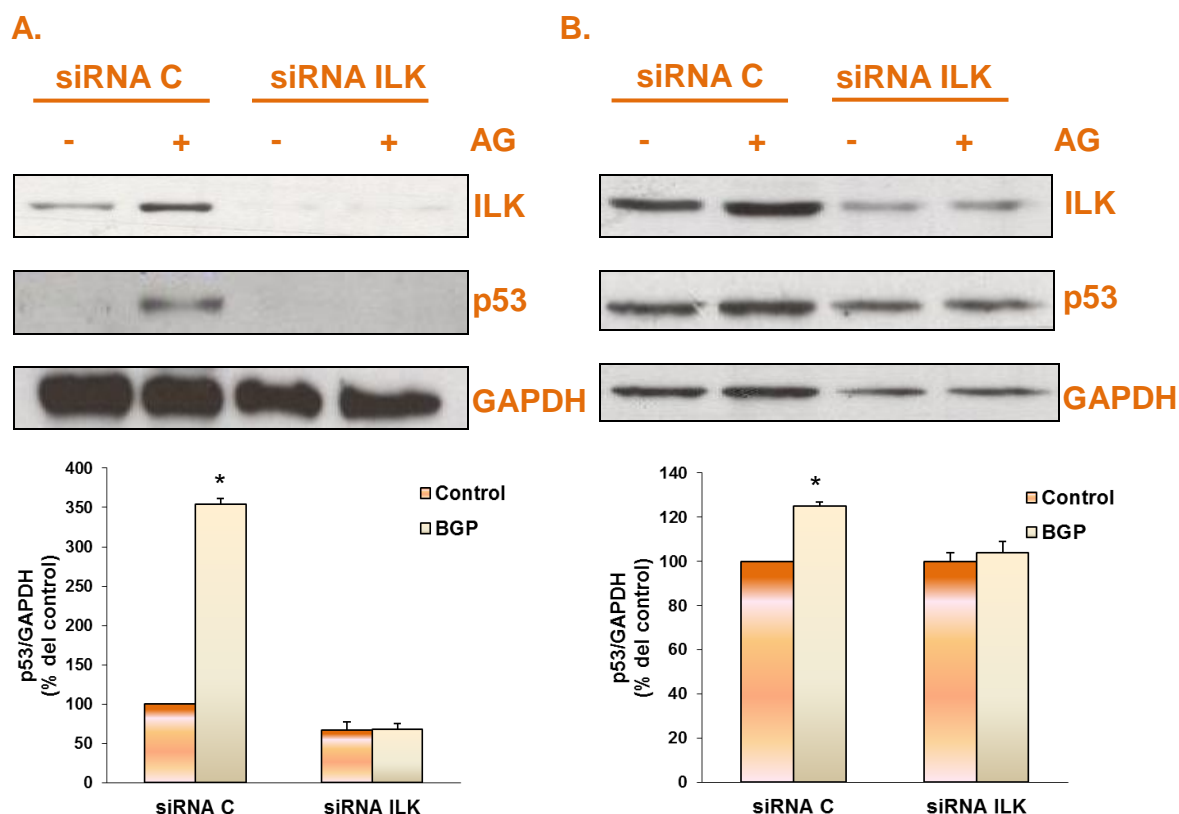


Figura 28. El silenciamiento de ILK previno el aumento de p53 inducido por AG. (A) Análisis de la expresión de p53 en células CMH transfectadas con ARN de interferencia contra ILK 20nM (siRNA ILK) o ARN sin diana (siRNA C) y tratadas con AG 100µg/ml durante 48h. **(B)** Medida de la expresión de p53 en células CTM tratadas de igual forma que las CMH. Arriba se muestra un blot representativo y abajo el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm error estándar de 3 experimentos. * $p < 0.05$ vs control.

En resumen:

- La AG y la GOx inducen senescencia celular a través de la vía de p53.
- Ambos estímulos senescentes inducen un aumento en los niveles de ILK y en su actividad quinasa.
- El aumento en los niveles de p53 fue dependiente de ILK. La delección de ILK produce la prevención del aumento de expresión de p53 en presencia de AG.

DISCUSIÓN

1. LOS ALTOS NIVELES DE FOSFATO SÉRICO EN RATONES DE 15 MESES VIENEN ACOMPAÑADOS DE SENESCENCIA CELULAR Y AUMENTO EN LOS NIVELES DE ILK EN CORTEZA RENAL.

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad como son el cáncer, enfermedades cardiovasculares, ictus, enfermedad renal crónica y desórdenes neurodegenerativos, las cuales constituyen las principales causas de muerte y discapacidad en la sociedad envejecida occidental. El retardo de fenómenos que tienen lugar durante el proceso de envejecimiento, en el caso de que fuera posible, podría constituir una forma de prevenir el desarrollo de dichas enfermedades, reducir la mortalidad y mejorar la calidad de vida (Kuro-o, 2010).

Los cambios que tienen lugar durante el proceso de envejecimiento conducen a la disminución funcional de varios órganos, incluido el riñón y el sistema cardiovascular (Davies et al., 1989). Las modificaciones de los riñones relacionadas con el envejecimiento incluyen cambios en la estructura glomerular, como son el engrosamiento de la membrana basal y expansión de la matriz mesangial (Razzaque, 2007); que a menudo se acompañan por cambios funcionales tubulares. A nivel vascular, el envejecimiento condiciona cambios estructurales y funcionales como son: hipertrofia del ventrículo izquierdo, calcificaciones de las válvulas cardíacas, disminución del número de miocitos y sustitución por tejido fibroso, endurecimiento de la pared del vaso arterial y estenosis. Funcionalmente, estos cambios se traducen en acortamiento de la fase de llenado diastólico, disfunción endotelial o aumento de la presión arterial sistólica, entre otras alteraciones (Wei, 1992; Cheitlin, 2003).

El proceso de envejecimiento puede ser acelerado o retardado por varios factores ambientales. Estudios recientes en animales, así como estudios epidemiológicos, han planteado la posibilidad de que el fosfato pudiera ser uno de estos factores. En un estudio de fisiología comparada se ha podido observar la existencia de una correlación negativa entre los niveles de fosfato en sangre y la longevidad de distintas especies (Kuro-o, 2010). Esto sugiere que puede existir una relación entre los elevados niveles de fosfato y la vida media.

Por otro lado, modelos animales de envejecimiento prematuro, como son el ratón deficiente en Klotho y el ratón deficiente en FGF23, presentan múltiples trastornos similares a los que tienen lugar durante el proceso de envejecimiento: hipogonadismo, retraso en el crecimiento, involución tímica, calcificación vascular, osteopenia, etc...acompañados de elevados niveles de fosfato en sangre (Kuro-o, 2011). El gen Klotho es uno de los factores que regulan el proceso de envejecimiento. Klotho codifica para una proteína transmembrana de 130KDa que se expresa principalmente en el riñón (Kuro-o et al., 1997). Su función fundamental es actuar como cofactor del receptor FGF23, hormona que regula la excreción de fosfato y la síntesis de vitamina D activa en el riñón (Kuro-o, 2006; Kurosaki et al., 2006; Urakawa et al., 2006). El papel de la hiperfosfatemia en el envejecimiento ha comenzado a ser explorado en los últimos años. Se ha visto que los fenotipos de envejecimiento prematuro observados en los ratones deficientes en Klotho y en FGF23 pueden ser revertidos mediante la disminución de la hiperfosfatemia por intervenciones genéticas y nutricionales, incluyendo la dieta baja en fosfato, dieta baja en vitamina D y el bloqueo de genes implicados en la reabsorción renal de fosfatos y la acción de la vitamina D (Morishita et al., 2001; Stubbs et al., 2007). Además, se ha observado que el aumento del fosfato en la dieta de ratones deficientes en Klotho, en los que el fenotipo de envejecimiento se ha revertido mediante el bloqueo de la absorción renal de fosfatos, induce envejecimiento (Ohnishi y Razzaque, 2010). Estas observaciones indican que la retención de fosfato podría ser la responsable de los fenotipos de envejecimiento, implicando una posible relación entre el envejecimiento y el fosfato.

La hiperfosfatemia se ha relacionado con la aparición de enfermedades vasculares, principalmente en pacientes con ERC, cuyos niveles de calcio y fósforo elevados aumentan las calcificaciones vasculares. Estos pacientes presentan niveles reducidos de Klotho (Foley, 2009). La reducción de los niveles de fosfato mediante el uso de quelantes o una dieta baja en fosfato ha sido considerada una estrategia terapéutica importante para el tratamiento de individuos con ERC.

Se ha descrito que el efecto de la hiperfosfatemia sobre el envejecimiento viene determinado por la inducción de estrés oxidativo y el aumento de la sensibilidad del receptor de insulina IGF-1, aunque los mecanismos implicados en estos procesos todavía no se han descrito en profundidad (Kuro-o, 2010).

Es de destacar que existe una fuerte relación entre el envejecimiento y la senescencia celular, que viene caracterizada por hipertrofia celular, aumento en la actividad β -galactosidasa a pH 6 y aumento en la expresión de inhibidores de ciclo celular como son p53, p16^{INK4a} y p21 (Hinkal et al., 2009). Estudios previos han mostrado que la actividad SA- β -gal y los niveles de expresión de p16^{INK4a} se encuentran aumentados en riñones envejecidos (Zhou et al., 2008; Yang y Fogo, 2010).

Por otro lado, ILK es una proteína citoplasmática que participa en el complejo de unión a integrinas. ILK se encuentra implicada en la regulación de numerosos procesos celulares tales como supervivencia, migración o invasión; así como en la acumulación de matriz extracelular. El papel de ILK en el envejecimiento ha comenzado a ser estudiado recientemente. Datos previos han mostrado que los niveles de ILK se encuentran aumentados en ratas viejas (Gu et al., 2005), abriendo un frente de estudio sobre el papel que puede jugar ILK dentro del proceso de envejecimiento. De igual forma, en un estudio realizado en cultivos primarios de células renales se ha podido observar como la expresión de ILK correlaciona positivamente con la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia y negativamente con la proliferación celular, sugiriendo que ILK podría estar implicada en el proceso de senescencia celular en el envejecimiento renal (Li et al., 2004). Sin embargo, aún se desconoce si el aumento en los niveles de ILK es una consecuencia del envejecimiento o es el incremento en la señalización a través de esta vía lo que promueve el envejecimiento. A favor de esta segunda idea se ha descrito que la sobreexpresión de ILK en cardiomiocitos acelera el proceso de senescencia celular y que la sobreexpresión de ILK viene acompañada de un aumento en la expresión de p53, p21 y un aumento en la actividad β -galactosidasa (Chen et al., 2006).

En el presente trabajo se describe que ratones de 15 meses presentan elevados niveles de fosfato asociados a senescencia celular y elevados niveles de ILK a nivel renal, postulándose el aumento en la expresión de los niveles de ILK como uno de los posibles mecanismos implicados en la inducción de senescencia celular por los altos niveles de fosfato.

Con el objetivo de analizar los posibles mecanismos responsables del aumento de los niveles de fosfato sérico en los ratones de 15 meses, que muestran los primeros signos de envejecimiento, se determinaron los niveles de expresión de Klotho en corteza renal. Los niveles de fosfato en sangre se encuentran mediados por reguladores como la vitamina D, PTH y FGF23/Klotho; que funcionan con una regulación de retroalimentación negativa (eje endocrino hueso-riñón-paratiroides) (Kuro-o, 2009; Wang y Sun, 2009). FGF23/Klotho se encuentran regulando la expresión de genes implicados en el metabolismo del Ca-Pi como son: el transportador de fosfato NaPi2a, la enzima 1 α -hidroxilasa y la enzima 24-hidroxilasa (Kuro, 2011). Los resultados muestran como los niveles de Klotho se encuentran disminuidos en los ratones de 15 meses con respecto a los ratones de 3 meses de edad. Estudios previos han mostrado que los niveles de expresión de Klotho se encuentran disminuidos en corteza renal de ratas viejas (Zuo et al., 2011).

Debido a la disminución en la expresión de la proteína anti-envejecimiento Klotho en nuestros ratones de 15 meses, es posible que FGF23 no lleve a cabo su acción normal en el riñón ya que no es capaz por sí solo de unirse a su receptor. De hecho en los resultados obtenidos se puede observar como, por un lado, los niveles del transportador NaPi2a se encuentran aumentados en corteza renal de ratones de 15 meses, lo que conlleva una mayor reabsorción de fosfato a nivel renal. Por otro lado, se puede observar como los niveles de la enzima 1 α -hidroxilasa se encuentran aumentados en los ratones de 15 meses mientras que los niveles de la enzima 24-hidroxilasa se encuentran disminuidos. En conjunto estos datos sugieren que los niveles de vitamina D activa podrían estar aumentados en los ratones de 15 meses. La vitamina D actuaría a nivel intestinal absorbiendo mayor cantidad de fosfato y por tanto provocando un aumento en los niveles de fosfato en plasma. En resumen, nuestros datos indicarían que el

aumento de los niveles de fosfato en plasma es debido a una mayor absorción renal e intestinal del fosfato como consecuencia de la disminución de los niveles de Klotho.

Cuando se analizó la senescencia celular en la corteza renal de estos animales se observó un ligero aumento en la expresión de p53 y un aumento significativo de la expresión de p16^{INK4a} en los ratones con 15 meses de edad con respecto a los ratones de 3 meses, indicando que los ratones viejos presentan senescencia celular.

Además, en nuestros ratones de 15 meses se observó un aumento en la expresión de ILK con respecto a los ratones de 3 meses a nivel de corteza renal. Este aumento en la expresión de ILK correlaciona positivamente con el aumento en los niveles de fosfato en plasma, mientras que muestra una correlación negativa con los niveles de expresión de Klotho.

En resumen, se puede decir que en los ratones de 15 meses de edad se observa un fenómeno de hiperfosfatemia, que puede ser debido a la disminución de los niveles de expresión de Klotho en corteza renal por alteración de la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo del Ca-Pi: NaPi-2a, 1 α -hidroxilasa y 24-hidroxilasa. Además, estos ratones viejos muestran senescencia celular y elevados niveles de expresión de ILK a nivel de corteza renal. Tomando en consideración los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que los efectos de la hiperfosfatemia son muy importantes a nivel cardiovascular, se procedió a analizar los efectos de los altos niveles de fosfato a nivel vascular, así como el papel que ILK pudiera tener en este proceso.

2. LOS ALTOS NIVELES DE FOSFATO INDUCEN SENESCENCIA CELULAR EN CÉLULAS VASCULARES DE MÚSCULO LISO HUMANAS A TRAVÉS DE UN AUMENTO EN LOS NIVELES DE ILK.

Para analizar si los altos niveles de fosfato inducían senescencia celular a nivel vascular y qué mecanismos podían estar implicados en este proceso, se realizaron estudios *in vitro* en células vasculares de músculo liso de aorta humanas (CML). Estas células presentan transportadores de fosfato

dependientes de sodio tipo III (Pit-1), siendo capaces de incorporar el fosfato presente en el plasma al interior celular. La captación de fosfato a través de Pit-1 es esencial para la calcificación de CMLs y su modulación fenotípica en respuesta a los altos niveles de fosfato (Li et al., 2006). El beta-glicerofosfato (BGP) es un compuesto utilizado como fuente exógena de fosfato. La liberación de fosfatos se produce *in vitro* por la actuación sobre el compuesto de la fosfatasa alcalina presente en CMLs. Estudios previos han mostrado que la exposición durante largos periodos de tiempo a BGP induce calcificación en células vasculares de musculo liso de ratón, siendo la calcificación vascular una de las principales consecuencias de la hiperfosfatemia asociada al envejecimiento (Chen et al., 2002).

Para el estudio de la senescencia celular inducida por la presencia de BGP, en primer lugar se evaluó la actividad de la enzima β -galactosidasa. Para completar el estudio de la senescencia celular se analizaron las vías inductoras de senescencia p53-p21 y p16^{INK4a} mediante western-blot.

Los resultados muestran un aumento en la actividad β -galactosidasa y en la expresión de p53, p21 y p16^{INK4a} tras el tratamiento con BGP. Para analizar si este aumento en la senescencia celular era específico de los altos niveles de fosfato, células CML se incubaron con un inhibidor del transportador de fosfato Pit-1, el ácido fosfonofórmico (PFA), que previene la calcificación vascular *in vitro* (Villa-Bellosta y Sorribas, 2009). En presencia del PFA no se observó aumento en la actividad β -galactosidasa ni en los niveles de expresión de p53 y p16^{INK4a} en respuesta a la presencia de BGP, mostrando un efecto específico de los altos niveles de fosfato sobre la senescencia celular.

ILK podría desempeñar un papel importante en el proceso de senescencia celular, siendo capaz de acelerar el proceso (Chen et al., 2006). Para comprobar si el efecto de la senescencia celular inducida por BGP pudiera ser debido a un aumento en los niveles de ILK, en primer lugar se analizó mediante western-blot el efecto del BGP sobre los niveles de expresión de ILK y su actividad, medida de forma indirecta mediante la determinación de los niveles de fosforilación de uno de sus principales substratos, GSK-3 β . Nuestros resultados muestran como

tras el tratamiento con BGP se produjo un aumento en los niveles de ILK y en su actividad. En segundo lugar, se silenció la expresión de ILK mediante el uso de un ARN de interferencia específico para ILK. El silenciamiento de ILK previno tanto del aumento en los niveles de p53 y p16^{INK4a} como el aumento en la actividad β -galactosidasa, lo que indica que la senescencia celular inducida por BGP es dependiente de ILK.

Para analizar las vías intracelulares mediadas por ILK que pudieran estar implicadas en el proceso de senescencia celular, se exploró la vía PI3K-Akt-FoxO. La vía de FoxO ha sido previamente relacionada con la senescencia celular en células de melanoma, donde ROS y JNK activan la expresión de p21 de forma dependiente de FoxO (de Keizer et al., 2010) y en células endoteliales tratadas con altas concentraciones de glucosa, en donde se observó que el aumento de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia era debido a una disminución en la expresión de la desacetilasa SIRT1, que también se encuentra regulando FoxO (Mortuza et al., 2013). ILK es una importante quinasa reguladora de la fosforilación de Akt en su Ser 473 (Persad et al., 2001). Los resultados muestran que tras la incubación de células CML con BGP se produjo un aumento en la fosforilación de Akt así como de su efector, FoxO. La fosforilación de Akt se mostró dependiente de ILK, puesto que cuando la expresión de ILK se silenció mediante el uso de un ARN de interferencia no se observó la fosforilación de Akt en su Ser 473 tras el tratamiento. Es bien conocido que la activación de ILK es dependiente de PI3K (Delcommenne et al., 1998). La inhibición farmacológica de la PI3K previno el aumento en ILK y el aumento en p53 y p16^{INK4a}, mostrando la importancia de dicha vía de señalización en la inducción de senescencia por BGP.

Como ya se observó, el tratamiento con BGP produce la activación de la vía PI3K-Akt-FoxO. FoxO es un factor de transcripción que al fosforilarse queda inhibido, impidiendo su translocación al núcleo y su actuación como factor de transcripción de enzimas antioxidantes, provocando así una situación de estrés oxidativo (Chen et al., 2010). Se ha mostrado que la activación de PI3K/Akt inducida por insulina e IGF-1 inhibe FoxO, resultando en un incremento en la formación de ROS en la célula (Kim et al., 2008). En un estudio realizado en

células vasculares de músculo liso aisladas de ratas viejas frente a ratas jóvenes se pudo observar como la expresión de la enzima mitocondrial MnSOD se encontraba reducida en las ratas viejas debido a una inactivación de FoxO3a (Li et al., 2006).

Numerosos estudios muestran un papel importante de los ROS en el desarrollo de la senescencia celular y el envejecimiento; siendo el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 los principales reguladores y moléculas de señalización implicados en la senescencia celular (Afanas'ev, 2010). Con el fin de conocer si entre los mecanismos intracelulares desencadenantes de la senescencia celular inducida por los altos niveles de fosfato, el estrés oxidativo desempeñaría un papel importante, se analizaron los niveles de ROS, de $O_2^{\cdot-}$ y de GSH reducido en CML tratadas con BGP. Los resultados obtenidos muestran como los niveles de ROS y de $O_2^{\cdot-}$, medidos con una sonda fluorescente, se vieron aumentados tras el tratamiento con BGP. Para determinar los niveles de GSH reducidos se usó el monoclorobimano (MCLB), sonda fluorescente que forma un aducto con el GSH reducido y cuya reacción es catalizada por la glutatión transferasa (Kamencic et al., 2000). Tras el tratamiento con BGP los niveles de GSH reducidos se encontraron disminuidos. Esta situación de estrés oxidativo celular es dependiente de ILK puesto que el silenciamiento con ILK previno dichos cambios en presencia del tratamiento con los altos niveles de fosfato.

Con el fin de analizar si la senescencia celular fue consecuencia del estrés oxidativo resultante del tratamiento con BGP, células CML fueron preincubadas con catalasa exógena o N-acetil-cisteína (NAC). La catalasa es una enzima antioxidante que también se encuentra regulada por el factor de transcripción FoxO (Li et al., 2008). NAC es una pequeña molécula que contiene un grupo tiol y que tiene propiedades antioxidantes (McCord y Fridovich, 1978). NAC repone los depósitos de glutatión, aumenta la actividad superóxido dismutasa, neutraliza los radicales libres hidroxilo e interfiere en la peroxidación lipídica (Tariq et al., 1999). El tratamiento con ambos antioxidantes previno el aumento de p53 y de $p16^{INK4a}$ tras el tratamiento con BGP. Indicando que el estrés oxidativo es el responsable de la senescencia celular.

Sin embargo, el tratamiento con NAC no previno el aumento en los niveles de ILK inducido por los altos niveles de fosfato, sugiriendo que el estrés oxidativo puede ser debido al aumento en los niveles de ILK, teniendo como consecuencia final la senescencia celular. Hasta la fecha poco se conoce sobre el posible papel que puede tener ILK en la inducción de estrés oxidativo. En nuestro grupo se ha observado que ILK es capaz de modular la expresión del ARN mensajero de la óxido nítrico sintasa a nivel de célula endotelial (eNOS) (Gonzalez-Santiago et al., 2002), estando la actividad de eNOS asociada a la producción de ROS mediante la generación de óxido nítrico (NO), el cual puede reaccionar con O_2^- dando lugar a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Xia et al., 1998). Por otro lado, datos del grupo muestran que los ROS podrían estar regulando la expresión de genes constitutivos, en concreto del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) mediante la activación de ILK en células mesangiales humanas. Se ha observado que la incubación de células mesangiales humanas con estímulos oxidantes como son glucosa oxidasa (GOx) y peróxido de hidrógeno, indujo un aumento en la expresión de TGF- β dependiente de ILK (Gonzalez-Ramos et al., 2013).

En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que el BGP induce senescencia en células vasculares de musculo liso de aorta humanas mediante un aumento en los niveles de ILK que, a través de la vía PI3K-Akt-FoxO, produce una situación de estrés oxidativo.

Para completar los estudios *in vitro* se analizaron los efectos de los altos niveles de fosfato en un modelo animal de calcificación vascular en ratas wistar, puesto que la calcificación vascular es uno de los principales efectos de la hiperfosfatemia (Chen et al., 2002). La calcificación vascular se indujo mediante nefrectomía 5/6 y la administración de una dieta rica en fosfato durante 12 semanas (PA). En el caso del grupo control las ratas fueron sometidas a la cirugía pero se les administró una dieta normal en fosfato (Control). Cuando se analizaron los niveles de fosfato en el plasma de estos animales, se observó que las ratas sometidas a una dieta rica en fosfato presentaban un aumento significativo en los niveles de fosfato, mientras que las ratas del grupo control presentaban niveles de fosfato en plasma dentro de los rangos de normalidad.

En las ratas con hiperfosfatemia se observó un aumento en la expresión de ILK en aorta, así como un aumento en la expresión de p53 y p16^{INK4a} con respecto a las ratas control. Estos resultados sugieren de nuevo la posible relación entre el aumento de los niveles de ILK y el proceso de senescencia celular inducido por los altos niveles de fosfato. Esta relación ha sido descrita por primera vez *in vivo* en este trabajo.

3. LA ALBUMINA GLICOSILADA Y LA GLUCOSA OXIDASA INDUCEN SENESCENCIA CELULAR MEDIDADA POR UN AUMENTO DE ILK EN DISTINTAS ESTIRPES CELULARES.

Con el fin de determinar si ILK pudiera estar mediando la senescencia celular independientemente de la hiperfosfatemia, se realizaron ensayos con distintos estímulos inductores de senescencia como son la albumina glicosilada (AG) y la glucosa oxidasa (GOx), en varias estirpes celulares: células mesangiales humanas (CMH) y células tubulares de ratón (CTM).

La albúmina glicosilada es uno de los productos de Amadori más abundante en sangre generado en el proceso de glicosilación avanzada. Distintos estudios epidemiológicos y patológicos han mostrado que la exposición a los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) se encuentra relacionada con la aparición de efectos adversos dependientes del envejecimiento. Su concentración es elevada en suero y tejidos de pacientes con enfermedad crónica renal así como en otras patologías relacionadas con el envejecimiento (Semba et al., 2010).

El riñón es el principal regulador del aclaramiento de AGEs y casi todas sus estructuras son susceptibles a ellos, incluyendo las membranas basales, el mesangio, células endoteliales, podocitos y túbulo (Gugliucci y Bendayan, 1995).

En nuestro grupo se ha descrito que la albumina glicosilada (AG) induce senescencia en células mesangiales humanas vía p53, mediante un descenso en los niveles de catalasa y un incremento en los niveles de ROS intracelulares a través de la activación del receptor IGF-1 y la vía Ras/Raf/Erk1/2 (Del Nogal-Avila et al., 2013).

Por otro lado, la glucosa oxidasa (GOx) es una enzima que produce peróxido de hidrógeno de forma constante a partir de la glucosa presente en los medios de incubación. Las especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, inducen estrés oxidativo y median eventos patológicos implicados en el desarrollo de muchas enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades relacionadas con el envejecimiento, así como senescencia de forma irreversible (Choi et al., 2012).

Los resultados muestran un aumento en la expresión de p53 tras el tratamiento con AG y con GOx en CMH y CTM. El tratamiento con ambos estímulos senescentes en ambas estirpes celulares indujo un aumento en la expresión de ILK así como un aumento de su actividad.

Cuando células CMH y CTM se transfectaron con un ARN de interferencia para ILK, el silenciamiento en la expresión del gen previnó el aumento en los niveles de p53 tras el tratamiento con AG.

Estos resultados muestran que estímulos senescentes distintos a la hiperfosfatemia, como son la AG y la GOx, inducen senescencia en células mesangiales humanas y células tubulares de ratón a través de la vía de p53, de nuevo, de forma dependiente de ILK. Esto sugiere un papel central de ILK dentro del proceso de senescencia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la idea de que la sobreexpresión de ILK por distintos estímulos se encuentra acelerando el proceso de senescencia celular y envejecimiento (Li et al., 2004; Chen et al., 2006).

CONCLUSIONES

- Los ratones de 15 meses muestran elevados niveles de fosfato en sangre. Esta hiperfosfatemia es debida a una disminución en los niveles de Klotho en corteza renal, que alterando la expresión de genes implicados en el metabolismo del Ca-Pi y por tanto la homeostasis del fosfato en el ratón, provoca un posible aumento en la absorción intestinal y renal del mismo.
- Los ratones de 15 meses muestran senescencia celular y elevados niveles de expresión de ILK a nivel de corteza renal. El aumento de expresión de ILK en ratones de 15 meses correlaciona positivamente con el aumento de los niveles de fosfato séricos.
- Las altas concentraciones de fosfato inducen senescencia en células vasculares de músculo liso de aorta humana de forma dependiente a ILK, a través de la inducción de estrés oxidativo por la vía PI3K-Akt-FoxO.
- Estímulos senescentes como son la albúmina glicosilada y la glucosa oxidada inducen senescencia en células mesangiales humanas y células tubulares de ratón, de forma dependiente de ILK, confirmando la importancia de ILK en la inducción del proceso de senescencia celular frente a distintos estímulos.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abboud, E.R., S. B. Coffelt, Y. G. Figueroa, K. J. Zvezdaryk, A. B. Nelson, D. E. Sullivan, C. B. Morris, Y. Tang, B. S. Beckman and A. B. Scandurro (2007). "*Integrin-linked kinase: a hypoxia-induced anti-apoptotic factor exploited by cancer cells.*" *Int J Oncol* 30(1): 113-122.

Acosta, J. C., A. O'Loughlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando and J. Gil (2008). "*Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence.*" *Cell* 133(6): 1006-1018.

Afanas'ev, I. (2010). "*Reactive oxygen species and age-related genes p66shc, Sirtuin, FOXO3 and Klotho in senescence.*" *Oxid Med Cell Longev* 3(2): 77-85.

Alimonti, A., C. Nardella, Z. Chen, J. G. Clohessy, A. Carracedo, L. C. Trotman, K. Cheng, S. Varmeh, S. C. Kozma, G. Thomas, E. Rosivatz, R. Woscholski, F. Cognetti, H. I. Scher and P. P. Pandolfi (2010). "*A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis.*" *J Clin Invest* 120(3): 681-693.

Alizadeh Naderi, A. S. and R. F. Reilly (2010). "*Hereditary disorders of renal phosphate wasting.*" *Nat Rev Nephrol* 6(11): 657-665.

Anamizu, Y., H. Kawaguchi, A. Seichi, S. Yamaguchi, E. Kawakami, N. Kanda, S. Matsubara, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, K. Nakamura and K. Oyanagi (2005). "*Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells.*" *Acta Neuropathol* 109(5): 457-466.

Anderson, E. J., M. E. Lustig, K. E. Boyle, T. L. Woodlief, D. A. Kane, C. T. Lin, J. W. Price, 3rd, L. Kang, P. S. Rabinovitch, H. H. Szeto, J. A. Houmard, R. N. Cortright, D. H. Wasserman and P. D. Neuffer (2009). "*Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans.*" *J Clin Invest* 119(3): 573-581.

Annenkov, A. (2009). "*The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signalling network regulating neurogenesis.*" *Mol Neurobiol* 40(3): 195-215.

Armeni, T., L. Ercolani, L. Urbanelli, A. Magini, F. Magherini, A. Pagnaloni, F. Piva, A. Modesti, C. Emiliani and G. Principato (2012). "*Cellular redox imbalance and changes of protein S-glutathionylation patterns are associated with senescence induced by oncogenic H-ras.*" *PLoS One* 7(12): e52151.

B

Barbera, M. J., I. Puig, D. Dominguez, S. Julien-Grille, S. Guaita-Esteruelas, S. Peiro, J. Baulida, C. Franci, S. Dedhar, L. Larue and A. Garcia de Herreros (2004). "*Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells.*" *Oncogene* 23(44): 7345-7354.

Bartek, J. and J. Lukas (2007). "*DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation.*" *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 238-245.

Bartkova, J., N. Rezaei, M. Lontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. D. Halazonetis, J. Bartek and V. G. Gorgoulis (2006). "*Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints.*" *Nature* 444(7119): 633-637.

- Beausejour, C. M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. W. Lowe, P. Yaswen and J. Campisi (2003). "Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways." *EMBO J* 22(16): 4212-4222.
- Bendayan, M. and J. K. Reddy (1982). "Immunocytochemical localization of catalase and heat-labile enoyl-CoA hydratase in the livers of normal and peroxisome proliferator-treated rats." *Lab Invest* 47(4): 364-369.
- Bendig, G., M. Grimmier, I. G. Huttner, G. Wessels, T. Dahme, S. Just, N. Trano, H. A. Katus, M. C. Fishman and W. Rottbauer (2006). "Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart." *Genes Dev* 20(17): 2361-2372.
- Beutler, E. (1969). "Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies." *J Clin Invest* 48(10): 1957-1966.
- Bindokas, V. P., J. Jordan, C. C. Lee and R. J. Miller (1996). "Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine." *J Neurosci* 16(4): 1324-1336.
- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum and O. Kalayci (2012). "Oxidative stress and antioxidant defense." *World Allergy Organ J* 5(1): 9-19.
- Blagosklonny, M. V. (2011). "Cell cycle arrest is not senescence." *Aging (Albany NY)* 3(2): 94-101.
- Blattner, S. M. and M. Kretzler (2005). "Integrin-linked kinase in renal disease: connecting cell-matrix interaction to the cytoskeleton." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14(4): 404-410.
- Block, G. A., P. S. Klassen, J. M. Lazarus, N. Ofsthun, E. G. Lowrie and G. M. Chertow (2004). "Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis." *J Am Soc Nephrol* 15(8): 2208-2218.
- Bose, S., S. French, F. J. Evans, F. Joubert and R. S. Balaban (2003). "Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate." *J Biol Chem* 278(40): 39155-39165.
- Boxem, M. (2006). "Cyclin-dependent kinases in *C. elegans*." *Cell Div* 1: 6.
- Boyer, C. J., A. D. Baines, E. Beaulieu and R. Beliveau (1998). "Immunodetection of a type III sodium-dependent phosphate cotransporter in tissues and OK cells." *Biochim Biophys Acta* 1368(1): 73-83.
- Brancaccio, M., E. Hirsch, A. Notte, G. Selvetella, G. Lembo and G. Tarone (2006). "Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy." *Cardiovasc Res* 70(3): 422-433.
- Braun, A., R. Bordoy, F. Stanchi, M. Moser, G. G. Kostka, E. Ehler, O. Brandau and R. Fassler (2003). "PINCH2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCH and localized to focal adhesions." *Exp Cell Res* 284(2): 239-250.
- Bueno, O. F. and J. D. Molkentin (2002). "Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death." *Circ Res* 91(9): 776-781.

C

- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 729-740.
- Carlberg, I. and B. Mannervik (1975). "Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver." *J Biol Chem* 250(14): 5475-5480.

- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." *Biotechniques* 15(3): 532-534, 536-537.
- Colman, R. J., R. M. Anderson, S. C. Johnson, E. K. Kastman, K. J. Kosmatka, T. M. Beasley, D. B. Allison, C. Cruzen, H. A. Simmons, J. W. Kemnitz and R. Weindruch (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." *Science* 325(5937): 201-204.
- Copin, J. C., Y. Gasche and P. H. Chan (2000). "Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase." *Free Radic Biol Med* 28(10): 1571-1576.
- Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez and J. Campisi (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* 6(12): 2853-2868.
- Cortez, V., B. C. Nair, D. Chakravarty and R. K. Vadlamudi (2011). "Integrin-linked kinase 1: role in hormonal cancer progression." *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 788-796.
- Cha, S. K., B. Ortega, H. Kurosu, K. P. Rosenblatt, O. M. Kuro and C. L. Huang (2008). "Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(28): 9805-9810.
- Chang, E. and C. B. Harley (1995). "Telomere length and replicative aging in human vascular tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24): 11190-11194.
- Chang, Q., S. Hoefs, A. W. van der Kemp, C. N. Topala, R. J. Bindels and J. G. Hoenderop (2005). "The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel." *Science* 310(5747): 490-493.
- Cheitlin, M. D. (2003). "Cardiovascular physiology-changes with aging." *Am J Geriatr Cardiol* 12(1): 9-13.
- Chen, C. C., S. M. Jeon, P. T. Bhaskar, V. Nogueira, D. Sundararajan, I. Tonic, Y. Park and N. Hay (2010). "FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor." *Dev Cell* 18(4): 592-604.
- Chen, C. D., S. Podvin, E. Gillespie, S. E. Leeman and C. R. Abraham (2007). "Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(50): 19796-19801.
- Chen, N. X., K. D. O'Neill, D. Duan and S. M. Moe (2002). "Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells." *Kidney Int* 62(5): 1724-1731.
- Chen, X., Z. Li, Z. Feng, J. Wang, C. Ouyang, W. Liu, B. Fu, G. Cai, C. Wu, R. Wei, D. Wu and Q. Hong (2006). "Integrin-linked kinase induces both senescence-associated alterations and extracellular fibronectin assembly in aging cardiac fibroblasts." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61(12): 1232-1245.
- Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffer, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (2005). "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis." *Nature* 436(7051): 725-730.
- Cheng, C. Y., M. Kuro-o and M. S. Razzaque (2011). "Molecular regulation of phosphate metabolism by fibroblast growth factor-23-klotho system." *Adv Chronic Kidney Dis* 18(2): 91-97.
- Chitnis, M. M., J. S. Yuen, A. S. Protheroe, M. Pollak and V. M. Macaulay (2008). "The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway." *Clin Cancer Res* 14(20): 6364-6370.

Choi, Y. J., J. Y. Lee, C. P. Chung and Y. J. Park (2012). "Cell-penetrating superoxide dismutase attenuates oxidative stress-induced senescence by regulating the p53-p21(Cip1) pathway and restores osteoblastic differentiation in human dental pulp stem cells." *Int J Nanomedicine* 7: 5091-5106.

D

d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter and S. P. Jackson (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* 426(6963): 194-198.

d'Adda di Fagagna, F., S. H. Teo and S. P. Jackson (2004). "Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response." *Genes Dev* 18(15): 1781-1799.

Dai, C., D. B. Stolz, S. I. Bastacky, R. St-Arnaud, C. Wu, S. Dedhar and Y. Liu (2006). "Essential role of integrin-linked kinase in podocyte biology: Bridging the integrin and slit diaphragm signaling." *J Am Soc Nephrol* 17(8): 2164-2175.

Dai, H. Y., M. Zheng, R. N. Tang, K. L. Ma, J. Ni and B. C. Liu (2012). "Inhibition of integrin-linked kinase by angiotensin II receptor antagonist, irbesartan attenuates podocyte injury in diabetic rats." *Chin Med J (Engl)* 125(5): 888-893.

Danisi, G., J. P. Bonjour and R. W. Straub (1980). "Regulation of Na-dependent phosphate influx across the mucosal border of duodenum by 1,25-dihydroxycholecalciferol." *Pflugers Arch* 388(3): 227-232.

Davies, I., A. P. Fotheringham and B. E. Faragher (1989). "Age-associated changes in the kidney of the laboratory mouse." *Age Ageing* 18(2): 127-133.

de Jager, S. M., S. Maughan, W. Dewitte, S. Scofield and J. A. Murray (2005). "The developmental context of cell-cycle control in plants." *Semin Cell Dev Biol* 16(3): 385-396.

de Keizer, P. L., L. M. Packer, A. A. Szypowska, P. E. Riedl-Polderman, N. J. van den Broek, A. de Bruin, T. B. Dansen, R. Marais, A. B. Brenkman and B. M. Burgering (2010). "Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence." *Cancer Res* 70(21): 8526-8536.

Del Nopal-Avila, M., N. Troyano-Suarez, P. Roman-Garcia, J. B. Cannata-Andia, M. Rodriguez-Puyol, D. Rodriguez-Puyol, O. M. Kuro and M. P. Ruiz-Torres (2013). "Amadori products promote cellular senescence activating insulin-like growth factor-1 receptor and down-regulating the antioxidant enzyme catalase." *Int J Biochem Cell Biol* S1357-2725(13):00093-9

Delcommenne, M., C. Tan, V. Gray, L. Rue, J. Woodgett and S. Dedhar (1998). "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19): 11211-11216.

Deng, J. T., C. Sutherland, D. L. Brautigan, M. Eto and M. P. Walsh (2002). "Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase." *Biochem J* 367(Pt 2): 517-524.

Deng, J. T., J. E. Van Lierop, C. Sutherland and M. P. Walsh (2001). "Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase." *J Biol Chem* 276(19): 16365-16373.

Dhalla, N. S., R. M. Temsah and T. Netticadan (2000). "Role of oxidative stress in cardiovascular diseases." *J Hypertens* 18(6): 655-673.

Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin and G. M. Wahl (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." *Genes Dev* 8(21): 2540-2551.

Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci and F. d'Adda di Fagagna (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." *Nature* 444(7119): 638-642.

Diez-Marques, M. L., C. Garcia-Escribano, J. Medina, M. C. Boyano-Adanez, E. Arilla, G. Torrecilla, D. Rodriguez-Puyol and M. Rodriguez-Puyol (1995). "Effects of somatostatin on cultured human mesangial cells." *Endocrinology* 136(8): 3444-3451.

Dillon, R. L., D. E. White and W. J. Muller (2007). "The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer." *Oncogene* 26(9): 1338-1345.

Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-9367.

Ding, L., L. Dong, X. Chen, L. Zhang, X. Xu, A. Ferro and B. Xu (2009). "Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction." *Circulation* 120(9): 764-773.

Doi, S., Y. Zou, O. Togao, J. V. Pastor, G. B. John, L. Wang, K. Shiizaki, R. Gotschall, S. Schiavi, N. Yorioka, M. Takahashi, D. A. Boothman and M. Kuro-o (2011). "Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice." *J Biol Chem* 286(10): 8655-8665.

Dorn, G. W., 2nd and T. Force (2005). "Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy." *J Clin Invest* 115(3): 527-537.

Drummond-Barbosa, D. (2008). "Stem cells, their niches and the systemic environment: an aging network." *Genetics* 180(4): 1787-1797.

Dupuy, C., A. Virion, R. Ohayon, J. Kaniewski, D. Deme and J. Pommier (1991). "Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane." *J Biol Chem* 266(6): 3739-3743.

Dusso, A. S., A. J. Brown and E. Slatopolsky (2005). "Vitamin D." *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): F8-28.

E

Eddy, A. A. (2000). "Molecular basis of renal fibrosis." *Pediatr Nephrol* 15(3-4): 290-301.

Edmonds, M. E., N. Morrison, J. W. Laws and P. J. Watkins (1982). "Medial arterial calcification and diabetic neuropathy." *Br Med J (Clin Res Ed)* 284(6320): 928-930.

El-Aouni, C., N. Herbach, S. M. Blattner, A. Henger, M. P. Rastaldi, G. Jarad, J. H. Miner, M. J. Moeller, R. St-Arnaud, S. Dedhar, L. B. Holzman, R. Wanke and M. Kretzler (2006). "Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis." *J Am Soc Nephrol* 17(5): 1334-1344.

El-Abbadi, M. and C. M. Giachelli (2005). "Arteriosclerosis, calcium phosphate deposition and cardiovascular disease in uremia: current concepts at the bench." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14(6): 519-524.

F

- Felsenfeld, A. J., M. Rodriguez and E. Aguilera-Tejero (2007). *"Dynamics of parathyroid hormone secretion in health and secondary hyperparathyroidism."* Clin J Am Soc Nephrol 2(6): 1283-1305.
- Filipenko, N. R., S. Attwell, C. Roskelley and S. Dedhar (2005). *"Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX."* Oncogene 24(38): 5837-5849.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). *"Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing."* Nature 408(6809): 239-247.
- Foley, R. N. (2009). *"Phosphate levels and cardiovascular disease in the general population."* Clin J Am Soc Nephrol 4(6): 1136-1139.
- Foley, R. N., A. J. Collins, C. A. Herzog, A. Ishani and P. A. Kalra (2009). *"Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults."* J Am Soc Nephrol 20(2): 397-404.
- Fontana, L., T. E. Meyer, S. Klein and J. O. Holloszy (2004). *"Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans."* Proc Natl Acad Sci U S A 101(17): 6659-6663.
- Franceschi, C., M. Capri, D. Monti, S. Giunta, F. Olivieri, F. Sevini, M. P. Panourgia, L. Invidia, L. Celani, M. Scurti, E. Cevenini, G. C. Castellani and S. Salvioli (2007). *"Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans."* Mech Ageing Dev 128(1): 92-105.
- Freund, A., A. V. Orjalo, P. Y. Desprez and J. Campisi (2010). *"Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences."* Trends Mol Med 16(5): 238-246.
- Frey, N., H. A. Katus, E. N. Olson and J. A. Hill (2004). *"Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?"* Circulation 109(13): 1580-1589.

G

- Gaasbeek, A. and A. E. Meinders (2005). *"Hypophosphatemia: an update on its etiology and treatment."* Am J Med 118(10): 1094-1101.
- Ganesh, S. K., A. G. Stack, N. W. Levin, T. Hulbert-Shearon and F. K. Port (2001). *"Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients."* J Am Soc Nephrol 12(10): 2131-2138.
- Gattineni, J. and M. Baum (2012). *"Genetic disorders of phosphate regulation."* Pediatr Nephrol 27(9): 1477-1487.
- Giachelli, C. M. (2009). *"The emerging role of phosphate in vascular calcification."* Kidney Int 75(9): 890-897.
- Glauser, D. A. and W. Schlegel (2007). *"The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells."* J Endocrinol 193(2): 195-207.
- Go, A. S., G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch and C. Y. Hsu (2004). *"Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization."* N Engl J Med 351(13): 1296-1305.

Goetz, R., A. Beenken, O. A. Ibrahimi, J. Kalinina, S. K. Olsen, A. V. Eliseenkova, C. Xu, T. A. Neubert, F. Zhang, R. J. Linhardt, X. Yu, K. E. White, T. Inagaki, S. A. Kliewer, M. Yamamoto, H. Kurosu, Y. Ogawa, M. Kuro-o, B. Lanske, M. S. Razzaque and M. Mohammadi (2007). "*Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members.*" *Mol Cell Biol* 27(9): 3417-3428.

Gonzalez-Santiago, L., S. Lopez-Ongil, M. Rodriguez-Puyol and D. Rodriguez-Puyol (2002). "*Decreased nitric oxide synthesis in human endothelial cells cultured on type I collagen.*" *Circ Res* 90(5): 539-545.

Gonzalez-Ramos, M., S. de Frutos, M. Grier, A. Luengo, G. Olmos, D. Rodriguez-Puyol, L. Calleros and M. Rodriguez-Puyol (2013). "*Integrin linked kinase mediates the hydrogen peroxide-dependent transforming growth factor-beta1 up-regulation.*" *Free Radic Biol Med*.

Gu, Y. J., X. M. Chen, S. W. Cui, X. F. Sun, Z. H. Li, S. Z. Shi, Y. Lu and G. Y. Cai (2005). "*[Expression and role of integrin-linking kinase in renal tubulointerstitial lesion of aging rats].*" *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 44(10): 764-768.

Gugliucci, A. and M. Bendayan (1995). "*Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry.*" *J Histochem Cytochem* 43(6): 591-600.

Guo, L., P. W. Sanders, A. Woods and C. Wu (2001). "*The distribution and regulation of integrin-linked kinase in normal and diabetic kidneys.*" *Am J Pathol* 159(5): 1735-1742.

Gu, Y. J., X. M. Chen, S. W. Cui, X. F. Sun, Z. H. Li, S. Z. Shi, Y. Lu and G. Y. Cai (2005). "*[Expression and role of integrin-linking kinase in renal tubulointerstitial lesion of aging rats].*" *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 44(10): 764-768.

Guo, W., H. Jiang, V. Gray, S. Dedhar and Y. Rao (2007). "*Role of the integrin-linked kinase (ILK) in determining neuronal polarity.*" *Dev Biol* 306(2): 457-468.

Gutierrez, O., T. Isakova, E. Rhee, A. Shah, J. Holmes, G. Collerone, H. Juppner and M. Wolf (2005). "*Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease.*" *J Am Soc Nephrol* 16(7): 2205-2215.

Gutierrez, O. M., M. Mannstadt, T. Isakova, J. A. Rauh-Hain, H. Tamez, A. Shah, K. Smith, H. Lee, R. Thadhani, H. Juppner and M. Wolf (2008). "*Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis.*" *N Engl J Med* 359(6): 584-592.

H

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "*Hallmarks of cancer: the next generation.*" *Cell* 144(5): 646-674.

Hannigan, G., A. A. Troussard and S. Dedhar (2005). "*Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK.*" *Nat Rev Cancer* 5(1): 51-63.

Hannigan, G. E., J. G. Coles and S. Dedhar (2007). "*Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair, and disease.*" *Circ Res* 100(10): 1408-1414.

Hannigan, G. E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppelino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell and S. Dedhar (1996). "*Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase.*" *Nature* 379(6560): 91-96.

- Haq, S., A. Michael, M. Andreucci, K. Bhattacharya, P. Dotto, B. Walters, J. Woodgett, H. Kilter and T. Force (2003). "Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4610-4615.
- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* 345(6274): 458-460.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* 11(3): 298-300.
- Harmer, N. J., L. Pellegrini, D. Chirgadze, J. Fernandez-Recio and T. L. Blundell (2004). "The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity." *Biochemistry* 43(3): 629-640.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* 246(4930): 629-634.
- Hashimoto, F. and H. Hayashi (1990). "Significance of catalase in peroxisomal fatty acyl-CoA beta-oxidation: NADH oxidation by acetoacetyl-CoA and H₂O₂." *J Biochem* 108(3): 426-431.
- Hattenhauer, O., M. Traebert, H. Murer and J. Biber (1999). "Regulation of small intestinal Na-P(i) type IIb cotransporter by dietary phosphate intake." *Am J Physiol* 277(4 Pt 1): G756-762.
- Haverty, T. P., C. J. Kelly, W. H. Hines, P. S. Amenta, M. Watanabe, R. A. Harper, N. A. Kefalides and E. G. Neilson (1988). "Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis." *J Cell Biol* 107(4): 1359-1368.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* 37: 614-636.
- Hesse, M., L. F. Frohlich, U. Zeitz, B. Lanske and R. G. Erben (2007). "Ablation of vitamin D signaling rescues bone, mineral, and glucose homeostasis in Fgf-23 deficient mice." *Matrix Biol* 26(2): 75-84.
- Hilfiker, H., O. Hattenhauer, M. Traebert, I. Forster, H. Murer and J. Biber (1998). "Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24): 14564-14569.
- Hinkal, G. W., C. E. Gatz, N. Parikh and L. A. Donehower (2009). "Altered senescence, apoptosis, and DNA damage response in a mutant p53 model of accelerated aging." *Mech Ageing Dev* 130(4): 262-271.
- Ho, B. and M. P. Bendeck (2009). "Integrin linked kinase (ILK) expression and function in vascular smooth muscle cells." *Cell Adh Migr* 3(2): 174-176.
- Hofmann, B., H. J. Hecht and L. Flohe (2002). "Peroxiredoxins." *Biol Chem* 383(3-4): 347-364.
- Holzenberger, M., J. Dupont, B. Ducos, P. Leneuve, A. Geloën, P. C. Even, P. Cervera and Y. Le Bouc (2003). "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice." *Nature* 421(6919): 182-187.
- Hu, M. C., M. Shi, J. Zhang, J. Pastor, T. Nakatani, B. Lanske, M. S. Razzaque, K. P. Rosenblatt, M. G. Baum, M. Kuro-o and O. W. Moe (2010). "Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule." *FASEB J* 24(9): 3438-3450.
- Hu, M. C., M. Shi, J. Zhang, H. Quinones, C. Griffith, M. Kuro-o and O. W. Moe (2011). "Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* 22(1): 124-136.

Huffman, D. M., D. R. Moellering, W. E. Grizzle, C. R. Stockard, M. S. Johnson and T. R. Nagy (2008). "Effect of exercise and calorie restriction on biomarkers of aging in mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(5): R1618-1627.

Hunt, J. L., R. Fairman, M. E. Mitchell, J. P. Carpenter, M. Golden, T. Khalapyan, M. Wolfe, D. Neschis, R. Milner, B. Scoll, A. Cusack and E. R. Mohler, 3rd (2002). "Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study." *Stroke* 33(5): 1214-1219.

Hutson, S. M., G. D. Williams, D. A. Berkich, K. F. LaNoue and R. W. Briggs (1992). "A ^{31}P NMR study of mitochondrial inorganic phosphate visibility: effects of Ca^{2+} , Mn^{2+} , and the pH gradient." *Biochemistry* 31(5): 1322-1330.

I

Imanishi, Y., B. Hu, M. J. Jarzynka, P. Guo, E. Elishaev, I. Bar-Joseph and S. Y. Cheng (2007). "Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the $\alpha(5)\beta(1)$ integrin-mediated pathway." *Cancer Res* 67(9): 4254-4263.

Imura, A., A. Iwano, O. Tohyama, Y. Tsuji, K. Nozaki, N. Hashimoto, T. Fujimori and Y. Nabeshima (2004). "Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane." *FEBS Lett* 565(1-3): 143-147.

Iotti, S., R. Lodi, G. Gottardi, P. Zaniol and B. Barbiroli (1996). "Inorganic phosphate is transported into mitochondria in the absence of ATP biosynthesis: an *in vivo* ^{31}P NMR study in the human skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 225(1): 191-194.

Ito, A., C. H. Lai, X. Zhao, S. Saito, M. H. Hamilton, E. Appella and T. P. Yao (2001). "p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2." *EMBO J* 20(6): 1331-1340.

J

Jenner, P. (2003). "Oxidative stress in Parkinson's disease." *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S26-36; discussion S36-28.

John, G. B., C. Y. Cheng and M. Kuro-o (2011). "Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD." *Am J Kidney Dis* 58(1): 127-134.

Jono, S., M. D. McKee, C. E. Murry, A. Shioi, Y. Nishizawa, K. Mori, H. Morii and C. M. Giachelli (2000). "Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification." *Circ Res* 87(7): E10-17.

K

Kamemori, M., Y. Ohyama, M. Kurabayashi, K. Takahashi, R. Nagai and N. Furuya (2002). "Expression of Klotho protein in the inner ear." *Hear Res* 171(1-2): 103-110.

Kamencic, H., A. Lyon, P. G. Paterson and B. H. Juurlink (2000). "Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione." *Anal Biochem* 286(1): 35-37.

Kanwar, Y. S., J. Wada, L. Sun, P. Xie, E. I. Wallner, S. Chen, S. Chugh and F. R. Danesh (2008). "Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression." *Exp Biol Med* (Maywood) 233(1): 4-11.

Kavanaugh, M. P., D. G. Miller, W. Zhang, W. Law, S. L. Kozak, D. Kabat and A. D. Miller (1994). "Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are

- inducible sodium-dependent phosphate symporters.*" Proc Natl Acad Sci U S A 91(15): 7071-7075.
- Kenyon, C. (2005). *"The plasticity of aging: insights from long-lived mutants."* Cell 120(4): 449-460.
- Kestenbaum, B., J. N. Sampson, K. D. Rudser, D. J. Patterson, S. L. Seliger, B. Young, D. J. Sherrard and D. L. Andress (2005). *"Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease."* J Am Soc Nephrol 16(2): 520-528.
- Kim, D. H., J. Y. Kim, B. P. Yu and H. Y. Chung (2008). *"The activation of NF-kappaB through Akt-induced FOXO1 phosphorylation during aging and its modulation by calorie restriction."* Biogerontology 9(1): 33-47.
- Kim, Y. B., S. Choi, M. C. Choi, M. A. Oh, S. A. Lee, M. Cho, K. Mizuno, S. H. Kim and J. W. Lee (2008). *"Cell adhesion-dependent cofilin serine 3 phosphorylation by the integrin-linked kinase.c-Src complex."* J Biol Chem 283(15): 10089-10096.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu and G. Ruvkun (1997). *"daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans."* Science 277(5328): 942-946.
- Knoll, R., R. Postel, J. Wang, R. Kratzner, G. Hennecke, A. M. Vacaru, P. Vakeel, C. Schubert, K. Murthy, B. K. Rana, D. Kube, G. Knoll, K. Schafer, T. Hayashi, T. Holm, A. Kimura, N. Schork, M. R. Toliat, P. Nurnberg, H. P. Schultheiss, W. Schaper, J. Schaper, E. Bos, J. Den Hertog, F. J. van Eeden, P. J. Peters, G. Hasenfuss, K. R. Chien and J. Bakkers (2007). *"Laminin-alpha4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells."* Circulation 116(5): 515-525.
- Koh, N., T. Fujimori, S. Nishiguchi, A. Tamori, S. Shiomi, T. Nakatani, K. Sugimura, T. Kishimoto, S. Kinoshita, T. Kuroki and Y. Nabeshima (2001). *"Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney."* Biochem Biophys Res Commun 280(4): 1015-1020.
- Korenjak, M. and A. Brehm (2005). *"E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development."* Curr Opin Genet Dev 15(5): 520-527.
- Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho and A. E. Vercesi (2001). *"Mitochondrial permeability transition and oxidative stress."* FEBS Lett 495(1-2): 12-15.
- Kretzler, M., V. P. Teixeira, P. G. Unschuld, C. D. Cohen, R. Wanke, I. Edenhofer, P. Mundel, D. Schlondorff and H. Holthofer (2001). *"Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria."* FASEB J 15(10): 1843-1845.
- Kristiansen, K. A., P. E. Jensen, I. M. Moller and A. Schulz (2009). *"Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H(2)DCFDA and confocal laser microscopy."* Physiol Plant 136(4): 369-383.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2010). *"The essence of senescence."* Genes Dev 24(22): 2463-2479.
- Kumar, A. S., I. Naruszewicz, P. Wang, C. Leung-Hagesteijn and G. E. Hannigan (2004). *"ILKAP regulates ILK signaling and inhibits anchorage-independent growth."* Oncogene 23(19): 3454-3461.
- Kuro-o, M. (2006). *"Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism."* Curr Opin Nephrol Hypertens 15(4): 437-441.
- Kuro-o, M. (2008). *"Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts."* Trends Endocrinol Metab 19(7): 239-245.

Kuro-o, M. (2009). "*Klotho in chronic kidney disease--what's new?*" *Nephrol Dial Transplant* 24(6): 1705-1708.

Kuro-o, M. (2010). "*A potential link between phosphate and aging--lessons from Klotho-deficient mice.*" *Mech Ageing Dev* 131(4): 270-275.

Kuro-o, M. (2011). "*Klotho and the aging process.*" *Korean J Intern Med* 26(2): 113-122.

Kuro, O. M. (2011). "*Phosphate and Klotho.*" *Kidney Int Suppl*(121): S20-23.

Kuro-o, M., Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Kawaguchi, T. Suga, T. Utsugi, Y. Ohyama, M. Kurabayashi, T. Kaname, E. Kume, H. Iwasaki, A. Iida, T. Shiraki-Iida, S. Nishikawa, R. Nagai and Y. I. Nabeshima (1997). "*Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing.*" *Nature* 390(6655): 45-51.

Kurosuo, H., Y. Ogawa, M. Miyoshi, M. Yamamoto, A. Nandi, K. P. Rosenblatt, M. G. Baum, S. Schiavi, M. C. Hu, O. W. Moe and M. Kuro-o (2006). "*Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho.*" *J Biol Chem* 281(10): 6120-6123.

Kurosuo, H., M. Yamamoto, J. D. Clark, J. V. Pastor, A. Nandi, P. Gurnani, O. P. McGuinness, H. Chikuda, M. Yamaguchi, H. Kawaguchi, I. Shimomura, Y. Takayama, J. Herz, C. R. Kahn, K. P. Rosenblatt and M. Kuro-o (2005). "*Suppression of aging in mice by the hormone Klotho.*" *Science* 309(5742): 1829-1833.

Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong and J. D. Erusalimsky (2000). "*Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.*" *J Cell Sci* 113 (Pt 20): 3613-3622.

L

Larjava, H., E. F. Plow and C. Wu (2008). "*Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion.*" *EMBO Rep* 9(12): 1203-1208.

Lau, W. L., A. Pai, S. M. Moe and C. M. Giachelli (2011). "*Direct effects of phosphate on vascular cell function.*" *Adv Chronic Kidney Dis* 18(2): 105-112.

Lavi-Moshayoff, V., G. Wasserman, T. Meir, J. Silver and T. Naveh-Many (2010). "*PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop.*" *Am J Physiol Renal Physiol* 299(4): F882-889.

Lee, A. C., B. E. Fenster, H. Ito, K. Takeda, N. S. Bae, T. Hirai, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, B. H. Howard and T. Finkel (1999). "*Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species.*" *J Biol Chem* 274(12): 7936-7940.

Legate, K. R., E. Montanez, O. Kudlacek and R. Fassler (2006). "*ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1): 20-31.

LeRoith, D., H. Werner, D. Beitner-Johnson and C. T. Roberts, Jr. (1995). "*Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.*" *Endocr Rev* 16(2): 143-163.

Leung-Hageteijn, C., A. Mahendra, I. Naruszewicz and G. E. Hannigan (2001). "*Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1.*" *EMBO J* 20(9): 2160-2170.

Levin, A., G. L. Bakris, M. Molitch, M. Smulders, J. Tian, L. A. Williams and D. L. Andress (2007). "*Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease.*" *Kidney Int* 71(1): 31-38.

- Li, M., J. F. Chiu, J. Gagne and N. K. Fukagawa (2008). "Age-related differences in insulin-like growth factor-1 receptor signaling regulates Akt/FOXO3a and ERK/Fos pathways in vascular smooth muscle cells." *J Cell Physiol* 217(2): 377-387.
- Li, M., J. F. Chiu, B. T. Mossman and N. K. Fukagawa (2006). "Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of FOXO3a by Akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats." *J Biol Chem* 281(52): 40429-40439.
- Li, X., H. Y. Yang and C. M. Giachelli (2006). "Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification." *Circ Res* 98(7): 905-912.
- Li, Y., J. Yang, C. Dai, C. Wu and Y. Liu (2003). "Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis." *J Clin Invest* 112(4): 503-516.
- Li, Y., X. Tan, C. Dai, D. B. Stolz, D. Wang and Y. Liu (2009). "Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 20(9): 1907-1918.
- Li, Z., X. Chen, Y. Xie, S. Shi, Z. Feng, B. Fu, X. Zhang, G. Cai, C. Wu, D. Wu and Y. Gu (2004). "Expression and significance of integrin-linked kinase in cultured cells, normal tissue, and diseased tissue of aging rat kidneys." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59(10): 984-996.
- Lim, J. H., E. N. Kim, M. Y. Kim, S. Chung, S. J. Shin, H. W. Kim, C. W. Yang, Y. S. Kim, Y. S. Chang, C. W. Park and B. S. Choi (2012). "Age-associated molecular changes in the kidney in aged mice." *Oxid Med Cell Longev* 2012: 171383.
- Lin, A. W., M. Barradas, J. C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano and S. W. Lowe (1998). "Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling." *Genes Dev* 12(19): 3008-3019.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (2002). "The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view." *Redox Rep* 7(1): 55-57; author reply 59-60.
- Liu, H., M. M. Fergusson, R. M. Castilho, J. Liu, L. Cao, J. Chen, D. Malide, Rovira, II, D. Schimel, C. J. Kuo, J. S. Gutkind, P. M. Hwang and T. Finkel (2007). "Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging." *Science* 317(5839): 803-806.
- Liu, S., A. Gupta and L. D. Quarles (2007). "Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16(4): 329-335.
- Liu, Y., H. K. Sanoff, H. Cho, C. E. Burd, C. Torrice, J. G. Ibrahim, N. E. Thomas and N. E. Sharpless (2009). "Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging." *Aging Cell* 8(4): 439-448.
- Lu, H., P. W. Fedak, X. Dai, C. Du, Y. Q. Zhou, M. Henkelman, P. S. Mongroo, A. Lau, H. Yamabi, A. Hinek, M. Husain, G. Hannigan and J. G. Coles (2006). "Integrin-linked kinase expression is elevated in human cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice." *Circulation* 114(21): 2271-2279.
- Lu, T. and T. Finkel (2008). "Free radicals and senescence." *Exp Cell Res* 314(9): 1918-1922.

M

- Mackinnon, A. C., H. Qadota, K. R. Norman, D. G. Moerman and B. D. Williams (2002). "C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes." *Curr Biol* 12(10): 787-797.

- Malik, A. I. and K. B. Storey (2011). "Transcriptional regulation of antioxidant enzymes by FoxO1 under dehydration stress." *Gene* 485(2): 114-119.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2006). "Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target?" *Cancer Cell* 9(1): 2-4.
- Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." *Mutat Res* 424(1-2): 83-95.
- Martens, U. M., E. A. Chavez, S. S. Poon, C. Schmoor and P. M. Lansdorp (2000). "Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence." *Exp Cell Res* 256(1): 291-299.
- Martin, J. E. and M. T. Sheaff (2007). "Renal ageing." *J Pathol* 211(2): 198-205.
- Masoro, E. J. (2006). "Dietary restriction-induced life extension: a broadly based biological phenomenon." *Biogerontology* 7(3): 153-155.
- McCay, C. M. (1935). "Iodized Salt a Hundred Years Ago." *Science* 82(2128): 350-351.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1978). "The biology and pathology of oxygen radicals." *Ann Intern Med* 89(1): 122-127.
- McDonald, P. C., A. B. Fielding and S. Dedhar (2008). "Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology." *J Cell Sci* 121(Pt 19): 3121-3132.
- Melk, A. (2003). "Senescence of renal cells: molecular basis and clinical implications." *Nephrol Dial Transplant* 18(12): 2474-2478.
- Miller, D. G. and A. D. Miller (1994). "A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry." *J Virol* 68(12): 8270-8276.
- Miller, D. M., G. R. Buettner and S. D. Aust (1990). "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions." *Free Radic Biol Med* 8(1): 95-108.
- Miura, T., M. P. Mattson and M. S. Rao (2004). "Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells." *Aging Cell* 3(6): 333-343.
- Moiseeva, O., F. A. Mallette, U. K. Mukhopadhyay, A. Moores and G. Ferbeyre (2006). "DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation." *Mol Biol Cell* 17(4): 1583-1592.
- Morishita, K., A. Shirai, M. Kubota, Y. Katakura, Y. Nabeshima, K. Takeshige and T. Kamiya (2001). "The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc." *J Nutr* 131(12): 3182-3188.
- Morreau, H., N. J. Galjart, N. Gillemans, R. Willemsen, G. T. van der Horst and A. d'Azzo (1989). "Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein." *J Biol Chem* 264(34): 20655-20663.
- Mortuza, R., S. Chen, B. Feng, S. Sen and S. Chakrabarti (2013). "High glucose induced alteration of SIRT6 in endothelial cells causes rapid aging in a p300 and FOXO regulated pathway." *PLoS One* 8(1): e54514.
- Munro, J., N. I. Barr, H. Ireland, V. Morrison and E. K. Parkinson (2004). "Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock." *Exp Cell Res* 295(2): 525-538.
- Murray, A. W. (1993). "Cell-cycle control: turning on mitosis." *Curr Biol* 3(5): 291-293.

N

Nagai, T., K. Yamada, H. C. Kim, Y. S. Kim, Y. Noda, A. Imura, Y. Nabeshima and T. Nabeshima (2003). "Cognition impairment in the genetic model of aging *klotho* gene mutant mice: a role of oxidative stress." *FASEB J* 17(1): 50-52.

Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* 113(6): 703-716.

Nikolopoulos, S. N. and C. E. Turner (2002). "Molecular dissection of actopaxin-integrin-linked kinase-Paxillin interactions and their role in subcellular localization." *J Biol Chem* 277(2): 1568-1575.

O

Ogryzko, V. V., T. H. Hirai, V. R. Russanova, D. A. Barbie and B. H. Howard (1996). "Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent." *Mol Cell Biol* 16(9): 5210-5218.

Ohnishi, M., G. Hasegawa, M. Yamasaki, H. Obayashi, M. Fukui, T. Nakajima, Y. Ichida, H. Ohse, S. Mogami, T. Yoshikawa and N. Nakamura (2006). "Integrin-linked kinase acts as a pro-survival factor against high glucose-associated osmotic stress in human mesangial cells." *Nephrol Dial Transplant* 21(7): 1786-1793.

Ohnishi, M., T. Nakatani, B. Lanske and M. S. Razzaque (2009). "Reversal of mineral ion homeostasis and soft-tissue calcification of *klotho* knockout mice by deletion of vitamin D 1 α -hydroxylase." *Kidney Int* 75(11): 1166-1172.

Ohnishi, M. and M. S. Razzaque (2010). "Dietary and genetic evidence for phosphate toxicity accelerating mammalian aging." *FASEB J* 24(9): 3562-3571.

Ohtani, N., Z. Zebedee, T. J. Huot, J. A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi, A. D. Sharrocks, G. Peters and E. Hara (2001). "Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence." *Nature* 409(6823): 1067-1070.

Olsen, C. L., B. Gardie, P. Yaswen and M. R. Stampfer (2002). "Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion." *Oncogene* 21(41): 6328-6339.

P

Papa, S. and V. P. Skulachev (1997). "Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging." *Mol Cell Biochem* 174(1-2): 305-319.

Parrinello, S., J. P. Coppe, A. Krtolica and J. Campisi (2005). "Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation." *J Cell Sci* 118(Pt 3): 485-496.

Passos, J. F., G. Nelson, C. Wang, T. Richter, C. Simillion, C. J. Proctor, S. Miwa, S. Olijslagers, J. Hallinan, A. Wipat, G. Saretzki, K. L. Rudolph, T. B. Kirkwood and T. von Zglinicki (2010). "Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence." *Mol Syst Biol* 6: 347.

Peiro, C., N. Lafuente, N. Matesanz, E. Cercas, J. L. Llergo, S. Vallejo, L. Rodriguez-Manas and C. F. Sanchez-Ferrer (2001). *"High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide."* Br J Pharmacol 133(7): 967-974.

Persad, S., A. A. Troussard, T. R. McPhee, D. J. Mulholland and S. Dedhar (2001). *"Tumor suppressor PTEN inhibits nuclear accumulation of beta-catenin and T cell/lymphoid enhancer factor 1-mediated transcriptional activation."* J Cell Biol 153(6): 1161-1174.

Persad, S., S. Attwell, V. Gray, N. Mawji, J. T. Deng, D. Leung, J. Yan, J. Sanghera, M. P. Walsh and S. Dedhar (2001). *"Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343."* J Biol Chem 276(29): 27462-27469.

Planas-Silva, M. D. and R. A. Weinberg (1997). *"The restriction point and control of cell proliferation."* Curr Opin Cell Biol 9(6): 768-772.

Plotnikov, A. N., S. R. Hubbard, J. Schlessinger and M. Mohammadi (2000). *"Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity."* Cell 101(4): 413-424.

Plovins, A., A. M. Alvarez, M. Ibanez, M. Molina and C. Nombela (1994). *"Use of fluorescein-di-beta-D-galactopyranoside (FDG) and C12-FDG as substrates for beta-galactosidase detection by flow cytometry in animal, bacterial, and yeast cells."* Appl Environ Microbiol 60(12): 4638-4641.

Puche, J. E. and I. Castilla-Cortazar (2012). *"Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency."* J Transl Med 10: 224.

Q

Quarles, L. D. (2003). *"FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization."* Am J Physiol Endocrinol Metab 285(1): E1-9.

Quarles, L. D. (2008). *"Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation."* J Clin Invest 118(12): 3820-3828.

Quelo, I., C. Gauthier, G. E. Hannigan, S. Dedhar and R. St-Arnaud (2004). *"Integrin-linked kinase regulates the nuclear entry of the c-Jun coactivator alpha-NAC and its coactivation potency."* J Biol Chem 279(42): 43893-43899.

R

Ramirez, R. D., C. P. Morales, B. S. Herbert, J. M. Rohde, C. Passons, J. W. Shay and W. E. Wright (2001). *"Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions."* Genes Dev 15(4): 398-403.

Razzaque, M. S., D. Sitara, T. Taguchi, R. St-Arnaud and B. Lanske (2006). *"Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process."* FASEB J 20(6): 720-722.

Razzaque, M. S. (2007). *"Does renal ageing affect survival?"* Ageing Res Rev 6(3): 211-222.
Rearden, A. (1994). *"A new LIM protein containing an autoepitope homologous to "senescent cell antigen".* Biochem Biophys Res Commun 201(3): 1124-1131.

Reynolds, J. L., A. J. Joannides, J. N. Skepper, R. McNair, L. J. Schurgers, D. Proudfoot, W. Jahnen-Dechent, P. L. Weissberg and C. M. Shanahan (2004). *"Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and*

phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD." **J Am Soc Nephrol** 15(11): 2857-2867.

Ribaric, S. (2012). *"Diet and aging."* *Oxid Med Cell Longev* 2012: 741468.

Robertson, B. W. and M. A. Chellaiah (2010). *"Osteopontin induces beta-catenin signaling through activation of Akt in prostate cancer cells."* *Exp Cell Res* 316(1): 1-11.

Rodier, F. and J. Campisi (2011). *"Four faces of cellular senescence."* *J Cell Biol* 192(4): 547-556.

Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos and J. Campisi (2009). *"Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion."* *Nat Cell Biol* 11(8): 973-979.

Rosano, L., F. Spinella, V. Di Castro, S. Dedhar, M. R. Nicotra, P. G. Natali and A. Bagnato (2006). *"Integrin-linked kinase functions as a downstream mediator of endothelin-1 to promote invasive behavior in ovarian carcinoma."* *Mol Cancer Ther* 5(4): 833-842.

Ross, R. (1999). *"Atherosclerosis--an inflammatory disease."* *N Engl J Med* 340(2): 115-126.

Roth, G. S., D. K. Ingram and M. A. Lane (2001). *"Caloric restriction in primates and relevance to humans."* *Ann N Y Acad Sci* 928: 305-315.

S

Saji, F., K. Shiizaki, S. Shimada, T. Okada, K. Kunimoto, T. Sakaguchi, I. Hatamura and T. Shigematsu (2009). *"Regulation of fibroblast growth factor 23 production in bone in uremic rats."* *Nephron Physiol* 111(4): p59-66.

Sakai, T., S. Li, D. Docheva, C. Grashoff, K. Sakai, G. Kostka, A. Braun, A. Pfeifer, P. D. Yurchenco and R. Fassler (2003). *"Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation."* *Genes Dev* 17(7): 926-940.

Saliba, W. and B. El-Haddad (2009). *"Secondary hyperparathyroidism: pathophysiology and treatment."* *J Am Board Fam Med* 22(5): 574-581.

Salih, D. A. and A. Brunet (2008). *"FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging."* *Curr Opin Cell Biol* 20(2): 126-136.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2004). *"Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton."* *Curr Biol* 14(14): 1296-1302.

Schiavi, S. C. and R. Kumar (2004). *"The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis."* *Kidney Int* 65(1): 1-14.

Segawa, H., F. Aranami, I. Kaneko, Y. Tomoe and K. Miyamoto (2009). *"The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism."* *Bone* 45 Suppl 1: S2-7.

Seidman, J. G. and C. Seidman (2001). *"The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms."* *Cell* 104(4): 557-567.

Semba, R. D., E. J. Nicklett and L. Ferrucci (2010). *"Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype?"* *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65(9): 963-975.

Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* 88(5): 593-602.

Shay, J. W. and I. B. Roninson (2004). "Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy." *Oncogene* 23(16): 2919-2933.

Shankland, S. J. (2006). "The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis." *Kidney Int* 69(12): 2131-2147.

Sherr, C. J. and F. McCormick (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." *Cancer Cell* 2(2): 103-112.

Shiizaki, K. and M. Kuro-o (2012). "[A potential link between phosphate and aging]." *Clin Calcium* 22(10): 1493-1498.

Shimada, T., H. Hasegawa, Y. Yamazaki, T. Muto, R. Hino, Y. Takeuchi, T. Fujita, K. Nakahara, S. Fukumoto and T. Yamashita (2004). "FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis." *J Bone Miner Res* 19(3): 429-435.

Shroff, R. C., R. McNair, J. N. Skepper, N. Figg, L. J. Schurgers, J. Deanfield, L. Rees and C. M. Shanahan (2010). "Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification." *J Am Soc Nephrol* 21(1): 103-112.

Shuto, E., Y. Taketani, R. Tanaka, N. Harada, M. Isshiki, M. Sato, K. Nashiki, K. Amo, H. Yamamoto, Y. Higashi, Y. Nakaya and E. Takeda (2009). "Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function." *J Am Soc Nephrol* 20(7): 1504-1512.

Son, B. K., K. Kozaki, K. Iijima, M. Eto, T. Kojima, H. Ota, Y. Senda, K. Maemura, T. Nakano, M. Akishita and Y. Ouchi (2006). "Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway." *Circ Res* 98(8): 1024-1031.

Son, B. K., K. Kozaki, K. Iijima, M. Eto, T. Nakano, M. Akishita and Y. Ouchi (2007). "Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells." *Eur J Pharmacol* 556(1-3): 1-8.

Steitz, S. A., M. Y. Speer, G. Curinga, H. Y. Yang, P. Haynes, R. Aebbersold, T. Schinke, G. Karsenty and C. M. Giachelli (2001). "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers." *Circ Res* 89(12): 1147-1154.

Storz, P. (2006). "Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases." *Sci STKE* 2006(332): re3.

Storz, P. (2011). "Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* 14(4): 593-605.

Stubbs, J. R., S. Liu, W. Tang, J. Zhou, Y. Wang, X. Yao and L. D. Quarles (2007). "Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice." *J Am Soc Nephrol* 18(7): 2116-2124.

T

Takemura, A., K. Iijima, H. Ota, B. K. Son, Y. Ito, S. Ogawa, M. Eto, M. Akishita and Y. Ouchi (2011). "Sirtuin 1 retards hyperphosphatemia-induced calcification of vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(9): 2054-2062.

Tan, C., S. Cruet-Hennequart, A. Troussard, L. Fazli, P. Costello, K. Sutton, J. Wheeler, M. Gleave, J. Sanghera and S. Dedhar (2004). "*Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK).*" *Cancer Cell* 5(1): 79-90.

Tariq, M., C. Morais, S. Sobki, M. Al Sulaiman and A. Al Khader (1999). "*N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats.*" *Nephrol Dial Transplant* 14(4): 923-929.

Teixeira Vde, P., S. M. Blattner, M. Li, H. J. Anders, C. D. Cohen, I. Edenhofer, N. Calvaresi, M. Merkle, M. P. Rastaldi and M. Kretzler (2005). "*Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage.*" *Kidney Int* 67(2): 514-523.

Thakker, R. V. (2012). "*Calcium-sensing receptor: Role in health and disease.*" *Indian J Endocrinol Metab* 16(Suppl 2): S213-216.

Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "*Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.*" *Cell* 139(5): 871-890.

Toshniwal, P. K. and E. J. Zarling (1992). "*Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis.*" *Neurochem Res* 17(2): 205-207.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1992). "*Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* 1979." *Biotechnology* 24: 145-149.

Troussard, A. A., P. C. McDonald, E. D. Wederell, N. M. Mawji, N. R. Filipenko, K. A. Gelmon, J. E. Kucab, S. E. Dunn, J. T. Emerman, M. B. Bally and S. Dedhar (2006). "*Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival.*" *Cancer Res* 66(1): 393-403.

Tsujikawa, H., Y. Kurotaki, T. Fujimori, K. Fukuda and Y. Nabeshima (2003). "*Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system.*" *Mol Endocrinol* 17(12): 2393-2403.

Tu, Y., Y. Huang, Y. Zhang, Y. Hua and C. Wu (2001). "*A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading.*" *J Cell Biol* 153(3): 585-598.

Tu, Y., F. Li and C. Wu (1998). "*Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways.*" *Mol Biol Cell* 9(12): 3367-3382.

U

Urakawa, I., Y. Yamazaki, T. Shimada, K. Iijima, H. Hasegawa, K. Okawa, T. Fujita, S. Fukumoto and T. Yamashita (2006). "*Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23.*" *Nature* 444(7120): 770-774.

Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigelius-Flohe, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg and L. Flohe (1995). "*Diversity of glutathione peroxidases.*" *Methods Enzymol* 252: 38-53.

V

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "*Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.*" *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.

van der Horst, A. and B. M. Burgering (2007). "*Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6): 440-450.

Vijayachandra, K., J. Lee and A. B. Glick (2003). "Smad3 regulates senescence and malignant conversion in a mouse multistage skin carcinogenesis model." *Cancer Res* 63(13): 3447-3452.

Villa-Bellosta, R. and V. Sorribas (2009). "Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(5): 761-766.

Virkki, L. V., J. Biber, H. Murer and I. C. Forster (2007). "Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families." *Am J Physiol Renal Physiol* 293(3): F643-654.

W

Wang, M., K. Dhingra, W. N. Hittelman, J. G. Liehr, M. de Andrade and D. Li (1996). "Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5(9): 705-710.

Wang, Y. and Z. Sun (2009). "Current understanding of klotho." *Ageing Res Rev* 8(1): 43-51.

Wei, J. Y. (1992). "Age and the cardiovascular system." *N Engl J Med* 327(24): 1735-1739.

White, D. E., P. Coutu, Y. F. Shi, J. C. Tardif, S. Nattel, R. St Arnaud, S. Dedhar and W. J. Muller (2006). "Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure." *Genes Dev* 20(17): 2355-2360.

White, K. E., B. Lorenz, W. E. Evans, T. Meitinger, T. M. Strom and M. J. Econs (2000). "Molecular cloning of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T8, and analysis as a candidate autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene." *Gene* 246(1-2): 347-356.

Williams, G. H. and K. Stoeber (2012). "The cell cycle and cancer." *J Pathol* 226(2): 352-364.

Wolf, G. (2000). "Cell cycle regulation in diabetic nephropathy." *Kidney Int Suppl* 77: S59-66.

Wolf, G., S. Chen and F. N. Ziyadeh (2005). "From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy." *Diabetes* 54(6): 1626-1634.

Wu, C. (2001). "ILK interactions." *J Cell Sci* 114(Pt 14): 2549-2550.

X

Xia, Y., A. L. Tsai, V. Berka and J. L. Zweier (1998). "Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process." *J Biol Chem* 273(40): 25804-25808.

Xie, D., D. Yin, X. Tong, J. O'Kelly, A. Mori, C. Miller, K. Black, D. Gui, J. W. Said and H. P. Koeffler (2004). "Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways." *Cancer Res* 64(6): 1987-1996.

Y

Yang, H. and A. B. Fogo (2010). "Cell senescence in the aging kidney." *J Am Soc Nephrol* 21(9): 1436-1439.

Yang, J. and Y. Liu (2001). "Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis." *Am J Pathol* 159(4): 1465-1475.

Yang, J. and Y. Liu (2002). "Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 13(1): 96-107.

Yasunaga, T., M. Kusakabe, H. Yamanaka, H. Hanafusa, N. Masuyama and E. Nishida (2005). "Xenopus ILK (integrin-linked kinase) is required for morphogenetic movements during gastrulation." *Genes Cells* 10(4): 369-379.

Yoshida, T., T. Fujimori and Y. Nabeshima (2002). "Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene." *Endocrinology* 143(2): 683-689.

Yu, X. and K. E. White (2005). "FGF23 and disorders of phosphate homeostasis." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2): 221-232.

Z

Zervas, C. G., S. L. Gregory and N. H. Brown (2001). "Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane." *J Cell Biol* 152(5): 1007-1018.

Zetterberg, A. and O. Larsson (1985). "Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(16): 5365-5369.

Zhang, Y., K. Chen, L. Guo and C. Wu (2002). "Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration." *J Biol Chem* 277(41): 38328-38338.

Zhang, Y., B. Gan, D. Liu and J. H. Paik (2011). "FoxO family members in cancer." *Cancer Biol Ther* 12(4): 253-259.

Zhang, Y., L. Guo, K. Chen and C. Wu (2002). "A critical role of the PINCH-integrin-linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration." *J Biol Chem* 277(1): 318-326.

Zhou, X. J., D. Rakheja, X. Yu, R. Saxena, N. D. Vaziri and F. G. Silva (2008). "The aging kidney." *Kidney Int* 74(6): 710-720.

Zuo, Z., H. Lei, X. Wang, Y. Wang, W. Sonntag and Z. Sun (2011). "Aging-related kidney damage is associated with a decrease in klotho expression and an increase in superoxide production." *Age (Dordr)* 33(3): 261-274.